



Desenvolvimento de Anticorpos Plásticos para um Biomarcador do Cancro

Catarina Alexandra Campos Vieira

“Dissertação apresentada no Instituto Superior de Engenharia do Porto do grau de Mestre
em Engenharia de Computação e Instrumentação Médica”

Orientadores: Doutora Goreti Sales e Mestre Liliana Truta

2014

Desenvolvimento de um Biossensor para um Biomarcador do Cancro

Catarina Alexandra Campos Vieira

ORIENTADORES

Doutora Goreti Sales

Mestre Liliana Truta

2014

“Dissertação apresentada no Instituto Superior de Engenharia do Porto do grau de Mestre
em Engenharia de Computação e Instrumentação Médica”

Agradecimentos

Quero agradecer àqueles que de diversas formas foram imprescindíveis para a finalização desta etapa da minha vida.

Exprimo o meu reconhecimento às pessoas que me rodeiam, à unidade de investigação e aos profissionais que me acolheram e suscitaram incentivo durante o projeto.

No entanto, não posso deixar de agradecer a algumas pessoas em particular.

À Doutora Goreti Sales, minha orientadora académica, pela oportunidade de poder realizar o meu projeto na BioMark Sensor Research. Além disso, por toda a sua disponibilidade, apoio incondicional, motivação e conhecimentos partilhados que foram muito importantes para a conclusão desta tese.

À Mestre Liliana Truta, minha coorientadora, por toda a paciência, atenção, incentivo e habilidades transmitidas durante este período.

Ao Doutor Carlos Ramos, diretor de curso, pela compreensão e apoio durante o meu percurso no ISEP.

Às Biomarcianas, Alexandra Santos, Ana Moreira, Ana Sacramento, Catarina Mouzelo, Felismina Moreira, Gabriela Martins, Helena Gomes, Lúcia Brandão, Margarida Piloto, Nádia Ferreira e Biomarciano Rui Gomes, pela convivência, simpatia e orientação necessários para refletir um desempenho favorável no desenrolar do projeto.

Este projeto revelou-se como uma experiência enriquecedora assim como proporcionou a vivência de um ambiente espetacular entre todos os elementos da BioMark Sensor Research.

A todos os meus amigos mais próximos que me acompanharam durante esta jornada e me trouxeram momentos que vão permanecer para sempre.

Ao meu companheiro, Vasco Teixeira, que me incentivou incondicionalmente e esteve sempre presente nos bons e maus momentos.

Resumo

O trabalho descrito compreende o desenvolvimento de um anticorpo plástico (MIP, do inglês *Molecularly Imprinted Polymer*) para o antígeno carcinoembrionário (CEA, do inglês *Carcinoembryonic Antigen*) e a sua aplicação na construção de dispositivos portáteis, de tamanho reduzido e de baixo custo, tendo em vista a monitorização deste biomarcador do cancro do colo-retal em contexto *Point-of-Care* (POC).

O anticorpo plástico foi obtido por tecnologia de impressão molecular orientada, baseada em eletropolimerização sobre uma superfície condutora de vidro recoberto por FTO. De uma forma geral, o processo foi iniciado pela electropolimerização de anilina sobre o vidro, seguindo-se a ligação por adsorção do biomarcador (CEA) ao filme de polianilina, com ou sem monómeros carregados positivamente (Cloreto de vinilbenziltrimetilamónio, VB). A última fase consistiu na electropolimerização de *o*-fenilenodiamina (oPD) sobre a superfície, seguindo-se a remoção da proteína por clivagem de ligações peptídicas, com o auxílio de tripsina. A eficiência da impressão do biomarcador CEA no material polimérico foi controlada pela preparação de um material análogo, NIP (do inglês, *Non-Imprinted Polymer*), no qual nem a proteína nem o monómero VB estavam presentes. Os materiais obtidos foram caracterizados quimicamente por técnicas de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR, do inglês, *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*) e microscopia confocal de Raman.

Os materiais sensores preparados foram entretanto incluídos em membranas poliméricas de Poli(cloreto de vinilo) (PVC) plastificado, para construção de sensores (biomiméticos) seletivos a CEA, tendo-se avaliado a resposta analítica em diferentes meios. Obteve-se uma boa resposta potenciométrica em solução tampão de Ácido 4-(2-hidroxietil)piperazina-1-etanosulfónico (HEPES), a pH 4,4, com uma membrana seletiva baseada em MIP preparada com o monómero carregado VB. O limite de deteção foi menor do que 42 pg/mL, observando-se um comportamento linear (*versus* o logaritmo da concentração) até 625 pg/mL, com um declive aniónico igual a -61,9 mV/década e $r^2 > 0,9974$. O comportamento analítico dos sensores biomiméticos foi ainda avaliado em urina, tendo em vista a sua aplicação na análise de CEA em urina. Neste caso, o limite de deteção foi menor do que 38 pg/mL, para uma resposta linear até 625 pg/mL, com um declive de -38,4 mV/década e $r^2 > 0,991$.

De uma forma geral, a aplicação experimental dos sensores biomiméticos evidenciou respostas exatas, sugerindo que os biossensores desenvolvidos prossigam estudos adicionais tendo em vista a sua aplicação em amostras de indivíduos doentes.

Palavras-chave: Impressão molecular; *Carcinoembryonic antigen*; Biomarcador do cancro; Eléktrodos seletivos de ião; Anticorpos plásticos; e Potenciometria.

Abstract

The proposed work concerns the development of a new plastic antibody (also known as Molecularly Imprinted Polymer, MIP) for carcinoembryonic antigen (CEA) and its application in the construction of portable, low-cost and small size potentiometric devices, to monitor this biomarker of colorectal cancer in point-of-care context.

The plastic antibody was obtained by molecularly-oriented imprinting technology, making use of electropolymerization over a conductive glass surface (FTO glass). In brief, this was done by electropolymerizing aniline over the conductive glass and adsorbing CEA to this surface, surrounded or not by positively charged monomers (vinylbenzyltrimethylammonium chloride, VB). This was followed by subsequent electropolymerization of *o*-phenylenediamine (oPD) monomer, after which CEA was removed by proteolytic action of trypsin. The effectiveness of the imprinting process of CEA over the polymeric material was controlled by preparing a similar material, named non-imprinted polymer (NIP), where protein and VB were omitted. The obtained materials were chemically characterized by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and confocal Raman spectroscopy.

The obtained materials were used to prepare biomimetic sensors for CEA, by including these within plasticized poly(vinyl chloride) (PVC) selective membranes. The sensors were evaluated in different conditions (pH and composition). Good analytical performance was obtained under 4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid (HEPES) buffer of pH 4.4, having selective membranes composed of MIP material with VB. The detection limit was <42 pg/mL, with a linear behaviour *versus* logarithm concentration up to 625 pg/mL, an average anionic slope of -61.9 mV/decade and a squared correlation coefficient >0.9974. The analytical behavior of the biomimetic sensors was evaluated in urine medium, because these devices were going to be applied in the determination of CEA in urine. Under this condition, the limit of detection was <38 pg/mL, for a linear behavior up to 625 µg/mL, an average slope of -38,4 mV/decade and a squared correlation coefficient >0.991.

In general, the experimental application of the biomimetic sensors has produced accurate results, suggesting that the current biosensors could follow additional study to enable their practical application in real samples of diseased individuals.

Keywords: Molecular imprinting; Carcinoembryonic antigen; Cancer biomarkers; Ion-selective electrodes; Plastic Antibodies; and Potentiometry.

Índice

| | |
|--|---------|
| 1. Introdução | 1 |
| 1.1. Cancro do colo-retal | 1 - 3 |
| 1.2. Biomarcador do cancro colo-retal (CEA) | 4 |
| 1.3. Métodos de quantificação do biomarcador CEA | 5 - 8 |
| 1.4. Polímeros de impressão molecular | 8 |
| 1.4.1. <i>Especificidades das proteínas</i> | 10 |
| 1.4.2. <i>Síntese</i> | 10 - 12 |
| 1.4.3. Recetores sintéticos <i>versus</i> naturais | 12, 13 |
| 1.5. Biossensores | 13 |
| 1.5.1. <i>Elemento de reconhecimento</i> | 14 |
| 1.5.2. <i>Transdução</i> | 14, 15 |
| 1.6. Potenciometria | 15 |
| 1.6.1. <i>Eléttodos</i> | 16 |
| 1.6.2. <i>Base teórica</i> | 18 |
| 1.6.3. <i>Curva de calibração</i> | 18, 19 |
| 1.6.4. <i>Tempo de resposta</i> | 19, 20 |
| 1.6.5. <i>Drift</i> | 20 |
| 1.6.6. <i>Efeito de pH</i> | 20, 21 |
| 1.6.7. <i>Selectividade</i> | 21, 22 |
| 2. Descrição Experimental | 23 |
| 2.1. Reagentes e soluções | 23, 24 |
| 2.2. Material e aparelhos utilizados | 24, 25 |
| 2.3. Preparação do material sensor | 25 - 29 |
| 2.4. Preparação de membranas seletivas | 29 - 32 |
| 2.5. Caraterização dos materiais sensores | 32 |
| 2.6. Procedimentos de avaliação do desempenho dos eléctrodos | 32, 33 |
| 3. Resultados e Discussão | 35 |
| 3.1. Preparação do material sensor | 35, 36 |
| 3.2. Caraterização do material sensor | 36 - 39 |
| 3.3. Caraterísticas Gerais de Funcionamento dos Sensores | 39 - 42 |
| 3.4. Seletividade em urina | 42 - 44 |
| 3.4.1. <i>Aplicação Analítica</i> | 44 - 46 |
| 4. Conclusão | 47 |
| 5. Referências Bibliográficas | 49 - 55 |

Lista de Figuras

| | | |
|---------------------|--|----|
| Figura 1.1. | Taxa padronizada pela idade por 100000 habitantes, de incidência e de mortalidade, por cancro colo-retal, de homens e mulheres, em Portugal, segundo dados do relatório GLOBOCAN 2008 da Agência Internacional de Investigação do Cancro (IARC)..... | 1 |
| Figura 1.2. | Taxa padronizada pela idade por 100000 habitantes, de incidência e de mortalidade, por tipo de cancro, em Portugal, segundo dados do relatório GLOBOCAN 2008 da Agência Internacional de Investigação do Cancro (IARC).... | 2 |
| Figura 1.3. | Imagem do intestino grosso cujas paredes apresentam lesões cancerígenas | 3 |
| Figura 1.4. | Representação esquemática do processo de impressão molecular | 9 |
| Figura 1.5. | Polimerização em <i>bulk</i> | 11 |
| Figura 1.6. | Representação esquemática de um biossensor | 13 |
| Figura 1.7. | Célula electroquímica com análise da potenciometria com recurso a um ESI | 16 |
| Figura 1.8. | Eléctrodo selectivo de ião | 17 |
| Figura 1.9. | Curva de calibração de um ESI. (— — —): sem variação nítida de potencial durante a variação da atividade a ou concentração c do ião alvo; (— — —): pequena variação de potencial com a variação de a ou c , sem corresponder ao esperado pela equação modificada de <i>Nernst-Nicolski</i> ; (—): resposta linear do potencial com a variação de a ou c , previsto na equação modificada de <i>Nernst-Nicolski</i> | 19 |
| Figura 1.10. | Representação gráfica do tempo de resposta t , ($\Delta E/\Delta t$) | 20 |
| Figura 2.1. | Montagem da célula potenciométrica, com equipamento medidor e acessórios (agitador magnético e sistema de leitura múltipla e sequencial de vários ESIs) | 25 |
| Figura 2.2. | Preparação dos MIPs sem e com monómero carregado positivamente (VB) | 26 |
| Figura 2.3. | Preparação de solução com proteína e monómero carregado e outra com proteína e solução tampão | 27 |
| Figura 2.4. | Vidros PANI com solução de proteína com (topo) ou sem (em baixo) monómero carregado positivamente (VB) | 27 |
| Figura 2.5. | Vidros PANI incubados em solução PBS | 27 |
| Figura 2.6. | Os vários vidros de polianilina modificados e tratados com tripsina..... | 28 |

| | | |
|---------------------|---|----|
| Figura 2.7. | Vidros com molde da proteína, sem molde e com monómero carregado (+) e molde | 28 |
| Figura 2.8. | Aspeto dos vidros após raspagem do material sensor (PANI-CEA/VB, PANI-CEA e PANI-PBS) e a sua armazenagem em tubos <i>eppendorf</i> | 29 |
| Figura 2.9. | Soluções das membranas seletivas de PVC | 30 |
| Figura 2.10. | Suporte dos ESIs para aplicação das membranas..... | 31 |
| Figura 2.11. | Membrana selectiva dos ESIs | 31 |
| Figura 3.1. | Espetros de Raman dos materiais sensores MIP sem monómero (PANI/CEA/oPD), MIP com monómero (PANI/CEA-VB/oPD) e NIP (PANI/oPD) | 37 |
| Figura 3.2. | Espetros de FTIR dos materiais sensores MIP sem monómero (PANI/CEA/oPD), MIP com monómero (PANI/CEA-VB/oPD) e NIP (PANI/oPD) | 38 |
| Figura 3.3. | Curvas de calibração em solução tampão HEPES, pH de 4,4 | 40 |
| Figura 3.4. | Curvas de calibração em solução tampão HEPES, pH de 5,8 | 42 |
| Figura 3.5. | Calibrações em urina diluída com diferentes valores de pH (4,3 e 4,9) | 43 |
| Figura 3.6. | Calibração do ESI 2 (esquerda) e aplicação numa amostra sucessivamente diluída | 45 |
| Figura 3.7. | Concentrações de CEA teóricas e experimentais obtidas em amostras de urina | 46 |

Lista de tabelas

| | |
|--|----|
| Tabela 1.1. Biomarcadores moleculares para a detecção do CRC | 4 |
| Tabela 1.2. Métodos/Imunoensaios para detecção do CEA | 5 |
| Tabela 1.3. Comparação entre anticorpos naturais e sintéticos (MIPs)..... | 12 |
| Tabela 2.1. Constituição e composição das membranas seletivas a CEA | 30 |
| Tabela 2.2. Constituição e composição das membranas seletivas a CEA | 32 |

Lista de abreviaturas

| | |
|---------------|--|
| ATR | Refletância difusa atenuada |
| CEA | Antigénio carcinoembrionário |
| CRC | <i>Colo-rectal cancer</i> |
| DLS | <i>Dynamic light scattering</i> |
| ELISA | Ensaio imunoenzimático |
| ESI | Eléctrodo seletivo de ião |
| F.e.m. | Força eletromotriz |
| FTIR | <i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i> |
| FTO | <i>Fluorine-Tin-Oxide</i> |
| HEPES | Ácido 4-(2-Hidroxietil)piperazino-1-etanosulfónico |
| IARC | <i>International Agency for Research on Cancer</i> |
| IRL | Intervalo de resposta linear |
| IUPAC | <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i> |
| LD | Limite de deteção |
| LIRL | Limite inferior de resposta linear |
| SERS | <i>Surface-enhanced Raman scattering</i> |
| SPR | <i>Surface-plasmon resonance</i> |
| MIP | <i>Molecularly imprinted polymer</i> |
| NIP | <i>Non-imprinted polymer</i> |
| oNPOE | <i>o</i> -Nitrofenil otil éter |
| oPD | <i>o</i> -Fenilenodiamina |
| PANI | Polianilina |
| PBS | <i>Phosphate Buffered Saline</i> |
| POC | <i>Point-of-Care</i> |
| PVC | <i>Poly(vinyl chloride)</i> |
| THF | Tetrahidrofurano |
| TOB | Brometo de <i>p</i> -tetraoctilamónio |

| | |
|-----------|--------------------------------------|
| TP | Tripsina |
| VB | Cloreto de vinilbenziltrimetilamónio |

1. Introdução

Ao longo do capítulo são abordadas as diversas noções teóricas que fundamentam o trabalho realizado ao longo desta tese. Referem-se, neste contexto, aspetos relativos ao biomarcador que é alvo deste estudo, o CEA, destacando-se no geral a sua composição, relevância e relação com o cancro colo-retal. São ainda referidos os métodos inerentes à construção de um biossensor para deteção do CEA.

1.1. Cancro do colo-retal

Mundialmente, o cancro do colo-retal é a terceira causa de morte por cancro. Segundo o relatório GLOBOCAN 2008 da Agência Internacional de Investigação do Cancro (IARC), a nível mundial, este tipo de cancro é a terceira forma mais comum de cancro no sexo masculino (663.000 casos) e a segunda forma mais comum no sexo feminino (570.000 casos) (Figura 1.1). Anualmente está estimada a ocorrência de cerca de 608.000 mortes no mundo e 212.000 mortes na Europa por cancro colo-retal, ocorrendo cerca de 413000 novos casos por ano na Europa e em Portugal (Figura 1.2) [1].

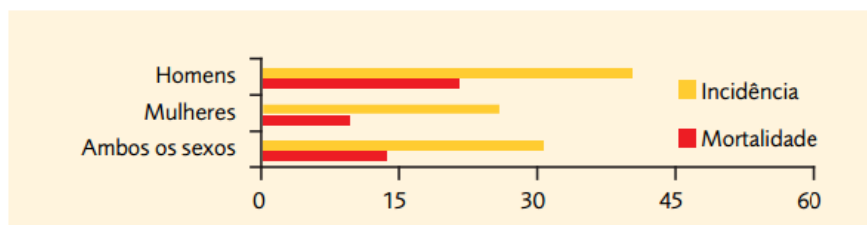


Figura 1.1. Taxa padronizada pela idade por 100000 habitantes, de incidência e de mortalidade, por cancro colo-retal, de homens e mulheres, em Portugal, segundo dados do relatório GLOBOCAN 2008 da Agência Internacional de Investigação do Cancro (IARC) [1].

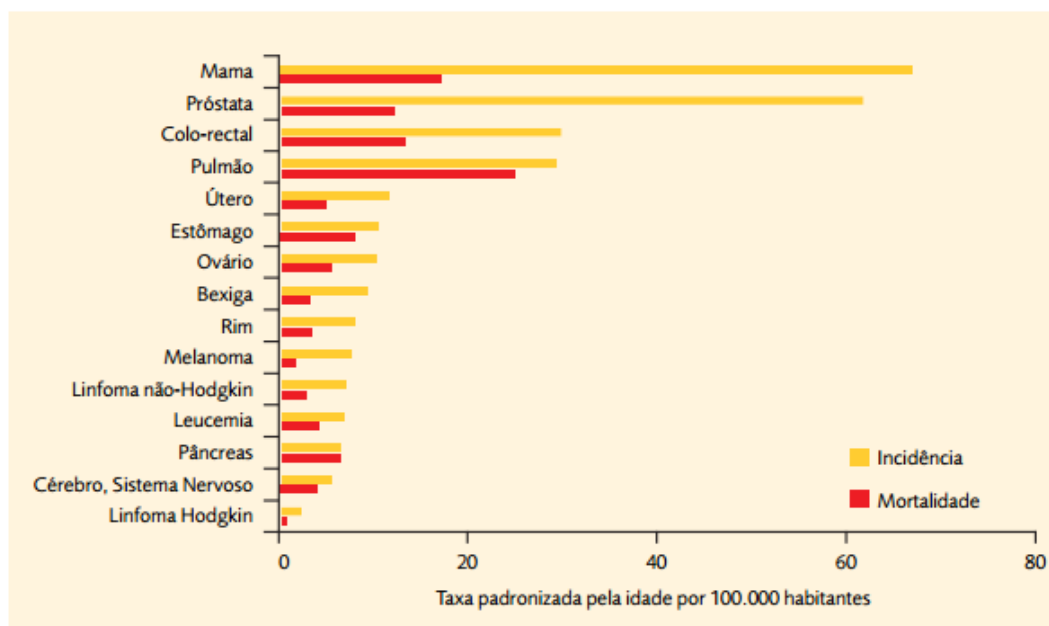


Figura 1.2. Taxa padronizada pela idade por 100000 habitantes, de incidência e de mortalidade, por tipo de cancro, em Portugal, segundo dados do relatório GLOBOCAN 2008 da Agência Internacional de Investigação do Cancro (IARC).

Em geral, o CRC (do inglês, *colo-rectal cancer*) tem como início lesões benignas no intestino grosso (Figura 1.3), designadas de adenomas ou de pólipos adenomatosos. Quando estas lesões assumem uma maior dimensão, a indução de transformações celulares está facilitada, podendo originar alterações na função, na estrutura e na forma das células, e, em última instância, a formação de um tumor maligno (ou cancro). A propagação das células tumorais para fora do cólon ou do reto conduz à disseminação desde cancro localizado para as regiões periféricas, sendo os gânglios linfáticos vizinhos os primeiros alvos [1].

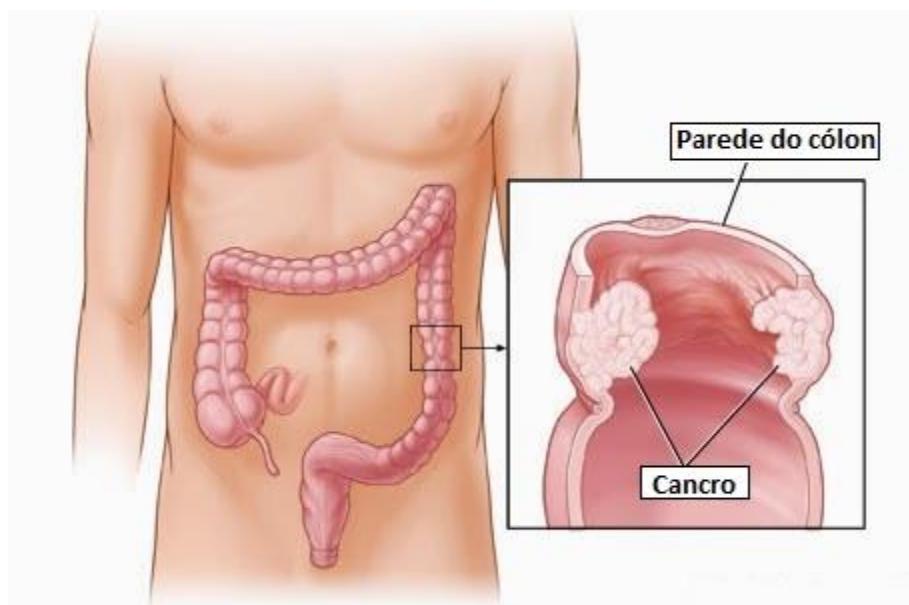


Figura 1.3. Imagem do intestino grosso cujas paredes apresentam lesões cancerígenas[2].

Atualmente, a detecção de lesões celulares associadas ao intestino é realizada por colonoscopia. Esta técnica tem contribuído muito positivamente para a detecção precoce do CRC, mas é um exame dispendioso e inconveniente. Cada indivíduo tem que, habitualmente, ser sujeito a uma anestesia geral para que o exame possa ser realizado com o cuidado e o tempo necessários. Um método alternativo à colonoscopia seria a monitorização de biomarcadores circulantes, com capacidade de diagnóstico e detecção do CRC numa fase inicial [3, 4].

Os biomarcadores são biomoléculas que atuam como indicadores do estado biológico dos tecidos e cuja monitorização proporciona a medição e a avaliação de processos biológicos, patogénicos ou de resposta terapêutica. De uma forma geral, uma alteração específica a nível molecular (material genético, proteína ou metabolito) e mensurável de uma célula cancerígena pode ser referida como um biomarcador de cancro. Quando esse biomarcador está presente em fluído circulante, tem a vantagem de permitir a avaliação da doença de modo não-invasivo.

É no entanto difícil identificar biomarcadores do cancro que apresentam a sensibilidade e a especificidade necessárias para dar origem um baixo número de resultados falsos, negativo e positivos [4]. Há atualmente um conjunto limitado de biomarcadores úteis do ponto de vista clínico no CRC, encontrando-se vários em fase de estudo/validação (tabela 1.1).

1.2. Biomarcador do cancro colo-retal (CEA)

O CEA é um dos biomarcadores mais utilizados ao nível mundial para o diagnóstico do CRC e para o acompanhamento da evolução da doença face à terapêutica, sendo dos testes com melhor relação custo-eficácia na deteção precoce, bem como em metástases hepáticas em pacientes já diagnosticados com CRC [4 - 6].

O CEA é uma proteína globular glicosilada com alto peso molecular (180 kDa), pertencente à superfamília das imunoglobulinas. O terminal carboxílico de CEA contém uma região hidrofóbica modificada para fornecer uma ligação de glicosil fosfatidilinositol à membrana celular. Tem um baixo ponto isoelétrico (~4.7), o que indica que esta proteína possui uma carga global negativa. Os níveis de CEA séricos normais em adultos são inferiores a 2,5 ng/mL, para não fumadores, ou a 5,0 ng/mL para fumadores [7].

Tabela 1.1. Biomarcadores moleculares para a deteção do CRC [4].

| Uso clínico | Tipos | Potenciais biomarcadores |
|------------------------------|-------------------|---|
| <i>Em uso</i> | Proteína | Hemoglobina fecal CEA |
| | Prot. Glicosilada | CA 19.9 |
| <i>Em Validação clínica</i> | DNA | K-ras |
| | | APC |
| | | L-DNA |
| | | P53 |
| | Proteína | TIMP-1 |
| <i>Em estudo pré-clínico</i> | Proteína | Spondin-2, DcR3, Trail-R2, Reg IV, MIC1 |
| | | PSME3 |
| | | NNMT |
| | | CRMP-2 |
| | | HNP 1-3 |
| | | MIF |
| | | M-CSF |
| | | M2-PK |
| | | Prolactin |
| | | CCSA-2, -3, -4 |
| | | MMP-9, -7 |
| | | Laminin |
| | | Septin 9 |
| | DNA | 5-gene panel (CDA, BANK1, BCNP1, MS4A1, MGC20553) |

1.3. Métodos de quantificação do biomarcador CEA

A grande importância do CEA no contexto clínico confere uma enorme relevância ao desenvolvimento de métodos alternativos para a monitorização deste biomarcador, sobretudo métodos sensíveis e rápidos.

É possível encontrar na literatura um conjunto vasto de trabalhos com este propósito, com deteção ótica ou elétrica, nomeadamente fluorescência (FL), colorimetria (COL), quimiluminescência (QL), DLS (*Dynamic light scattering*), SERS (*Surface-enhanced Raman scattering*) e SPR (*Surface plasmon resonance*), eletroquímica (EQ), amperometria (AMP) ou potenciometria (POT) [8, 9]. Estes trabalhos foram listados e descritos na tabela 1.2, destacando-se aqui o procedimento envolvido no reconhecimento de CEA e as gamas de concentração com interesse analítico.

Tabela 1.2. Métodos/Imunoensaios para deteção do CEA.

| Método | Procedimento envolvido no reconhecimento do CEA | IRL ng/mL | LD ng/mL | Ref. |
|------------|---|------------------------|-------------|------|
| POT | Imunossensor em chip de silício, revestido a ouro e modificado com grupos alcanotiol, para co-adsorção da CEA. | 2,5 – 250 | — | [10] |
| EQ | Imunossensor tipo sanduíche com nanocompósitos de ouro e grafeno em elétrodo de carbono vítreo com azul de prússia. | 0,05 – 350 | 0,01 | [11] |
| AMP | Imunossensor com nanopartículas de azul de prússia, revestidas de poli(cloreto de dialilmetilamónio) e de uma dupla camada de nanocristais de Au para ligação do anticorpo. | 0,5 – 10 10 – 120 | 0,2 | [12] |
| EQ | Imunossensor com nanopartículas de Au-TiO ₂ como plataforma sensora e múltiplos anticorpos marcados com peroxidase, funcionalizados com nanoesferas T. | 0,02 – 120 | 0,012 | [7] |
| EQ | Imunossensor com nanopartículas de grafeno azul de prússia/ouro. | 0,01 – 1,0 1,0 – 60 | 0,003 | [13] |
| EQ | Elétrodo de ouro com monocamada de tionina ligada covalentemente via cisteamina com cloreto de <i>p</i> -ftaloflo. | 0,6 – 17 17 – 200 | 0,2 | [14] |
| EQ | Imunossensor com anti-CEA imobilizado em elétrodos de pasta de carbono, modificada com nanopartículas de ouro e de Fe ₃ O ₄ . | 1,0 – 55 | 0,13 | [15] |
| EQ | Deposição de nanopartículas de ouro com anti-CEA em quitosano e elétrodo de carbono vítreo. | 0,5 – 80 | 0,27 | [16] |

| | | | | |
|-----------|---|-------------------------|----------------------|------|
| EQ | Imunossensor com partículas magnéticas revestidas com multicamadas de nanopartículas de ouro. | 0,005 – 50 | 0,001 | [17] |
| EQ | Imunossensor com anti-CEA sobre um eletrodo de ouro modificado com poli(2-aminotiofenol) e nanopartículas de ouro. | 1×10^{-7} – 10 | $1,5 \times 10^{-8}$ | [18] |
| EQ | Imunoensaio tipo sanduíche com nanoestruturas de ouro bimetalicas ligadas à enzima peroxidase. | 0,01 – 200 | $1,1 \times 10^{-4}$ | [19] |
| EQ | Elétrodo de ouro e nanopartículas de ouro modificadas com aptâmeros diferentes, na presença de 6-ferrocenil hexanotiol. | 1 – 200 | 0,5 | [20] |
| EQ | Imobilização do anti-CEA em nanopartículas magnéticas de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ e avaliação eletroquímica em fluxo. | 1,5 – 60 | 0,5 | [21] |
| EQ | Imobilização de anti-CEA em nanopartículas de ZnO/Au depositadas em superfície de ouro. | 0,1 – 70 70 – 200 | 0,01 | [22] |

AMP: Amperometria; EQ: Eletroquímica; IRL: Intervalo de resposta linear; LD: Limite de detecção; POT: Potenciometria.

Tabela 1.2. Métodos/Imunoensaios para detecção do CEA (*continuação*).

| Método | Procedimento envolvido no reconhecimento do CEA | IRL ng/mL | LD ng/mL | Ref. |
|---------------|--|---|----------------------|-------------|
| FL | Imunossensor em formato sanduíche numa estrutura simétrica de tubos capilares encapsulados de quartzo. | 0,7 – 80 | 0,0011 | [23] |
| FL | Esferas magnéticas revestidas com anticorpo monoclonal e ligadas a outro anticorpo monoclonal marcado com quelato de európio, para separação magnética do imunocomplexo. | 1 – 1000 | 0,5 | [24] |
| SPR | Imunoensaio tipo sanduíche com anti-CEA ligado a ácido 11-mercato-decanóico, em eletrodo de ouro. | 3 – 400 | 3 | [25] |
| SERS | Nanoesferas ocas de ouro e esferas magnéticas associadas aos anticorpos para detecção por Raman. | 0,001 a 0,01 | 0,001 | [26] |
| SERS | Imunoensaio de nanoestruturas de Au/SiO_2 envolvendo a imobilização dos anticorpos capturados pelas sondas do SERS. | 1×10^{-6} – 10 | $8,6 \times 10^{-7}$ | [27] |
| SERS | Imunoensaio com anti-CEA ligado a nanopartículas bimetalicas de Au/Ag via ácido 4-mercato-benzóico. | 5×10^{-3} a 5×10^5 | 0,005 | [28] |
| ICg | Uso de vários anticorpos e nanopartículas de ouro num dispositivo imunocromatográfico tipo teste de gravidez. | 10 – 200 | 5 | [29] |
| DLS | Medida baseada em tamanho de partícula com envolvimento de nanopartículas de Ag@Au. | 0,06 – 50 | 0,0356 | [30] |

| | | | | |
|------------|---|------------------------|-------|------|
| COL | Imunoensaio com anti-CEA marcados com biotina, para ligação a da peroxidase/estreptavidina. | 0,05 – 50 | 0,048 | [31] |
| EQ | Imunossensor preparado por imobilização de anticorpo CEA em peroxidase. | 0,5 – 3,0 3,0 – 120 | 0,4 | [32] |
| QL | Imunoensaio não competitivo, com coluna de imunoafinidade para CEA em fluxo. | 1,0 – 25 | 0,5 | [33] |
| QL | Imunoensaio com anti-CEA em nanopartículas de ouro, em condições de fluxo. | 0,1 – 1.000 | 0,02 | [34] |
| QL | Imunossensor tipo sanduíche com anti-CEA marcado com peroxidase imobilizada em partículas magnéticas. | Até 50 | 0,005 | [35] |
| QL | Nanopartículas de ouro conjugadas com anti-CEA marcadas com peroxidase. | 0,05 – 20 | 0,034 | [36] |

DLS: *Dynamic light scattering*; ELISA: Ensaios imunoenzimáticos; FL: Fluorescência; ICg: Imunocromatografia; IRL: Intervalo de resposta linear; LD: Limite de detecção; QL: Quimiluminescência; SERS: *Surface Enhanced Raman Spectroscopy*; SPR: *Surface Plasmon Resonance*.

Do ponto de vista físico, alguns dos métodos descritos decorrem em fase líquida, como aqueles baseados em fluorescência, colorimetria e DLS. Nestes trabalhos, o CEA é determinado diretamente em solução, por monitorização de uma propriedade ótica após a sua interação com um anticorpo específico [8, 9]. A grande parte dos trabalhos descritos decorre, porém, em fase sólida, por ligação do CEA a uma superfície devidamente modificada. Esta estratégia parece ser mais adequada à utilização em POC do que a anterior, sobretudo porque evita a manipulação de reagentes líquidos em contexto clínico. De uma forma geral, a concretização desta abordagem passa pelo desenvolvimento de biossensores associados a uma transdução adequada.

Do ponto de vista da reação envolvida na deteção de CEA, os trabalhos descritos são sobretudo imunoensaios, baseados na interação anticorpo/antigénio. O uso de anticorpos para a interação com CEA permite obter determinações com elevada seletividade, mas também com reduzida estabilidade, com elevado custo e com longos tempos de resposta. Estes biomateriais não são, por isso, os elementos ideais para utilização em programas de rastreio ou medições de rotina hospitalar. De uma forma geral, é possível evitar estas limitações através da substituição dos anticorpos naturais por recetores artificiais (biomiméticos) que são criados por técnicas de impressão molecular [37]. Estas técnicas são hoje comuns e sólidas, tendo início com os estudos de *Pauling* [38], em 1940, dedicados ao processo de formação dos anticorpos, e sendo suportada por interações mais ou menos dirigidas entre um material polimérico e o composto que foi impresso nessa estrutura mais ou menos rígida [39].

Neste contexto, descrevem-se de seguida os conceitos gerais associados à obtenção de polímeros de impressão molecular, tendo em vista a preparação de anticorpos plásticos para CEA e os conceitos gerais associados ao desenvolvimento de biossensores.

1.4. Polímeros de impressão molecular

A impressão molecular consiste, de uma forma simples, na impressão de locais com reconhecimento molecular específico numa rede polimérica (geralmente sintéticos) [40]. O processo geral que se encontra associado a esta impressão encontra-se representado na Figura 1.4, podendo dividir-se em duas fases principais. A primeira consiste na polimerização na presença do modelo molecular a ser impresso. O modelo da molécula é retido no interior de um complexo de pré-polimerização, composto por monómeros funcionais que interagem quimicamente com o modelo. Com o auxílio de um agente de ligação cruzada inicia-se a polimerização, a qual fixa espacialmente (em 3D) as interações modelo-monomero. A segunda fase consiste na remoção do modelo molecular do polímero para libertação das cavidades de reconhecimento molecular. O modelo impresso é removido sem perturbação da geometria da matriz, ficando o polímero molecularmente impresso com vários locais para reconhecimento do modelo impresso.

Os polímeros assim obtidos são polímeros molecularmente impressos (MIPs, do inglês, *Molecularly Imprinted Polymers*), química e mecanicamente estáveis, com locais de reconhecimento complementares e reconhecimento seletivo do modelo durante os procedimentos de re-ligação subsequentes. A impressão molecular é adquirida através da distribuição tridimensional de grupos funcionais e governada por interações eletrostáticas entre os monómeros e o modelo. Estas interações podem envolver ligações fortes, de natureza covalente, ou interações mais fracas, de natureza não-covalente, como as ligações de hidrogénio, as forças de *Van-der-Waals*, as interações iónicas e as interações hidrofóbicas [41-45].

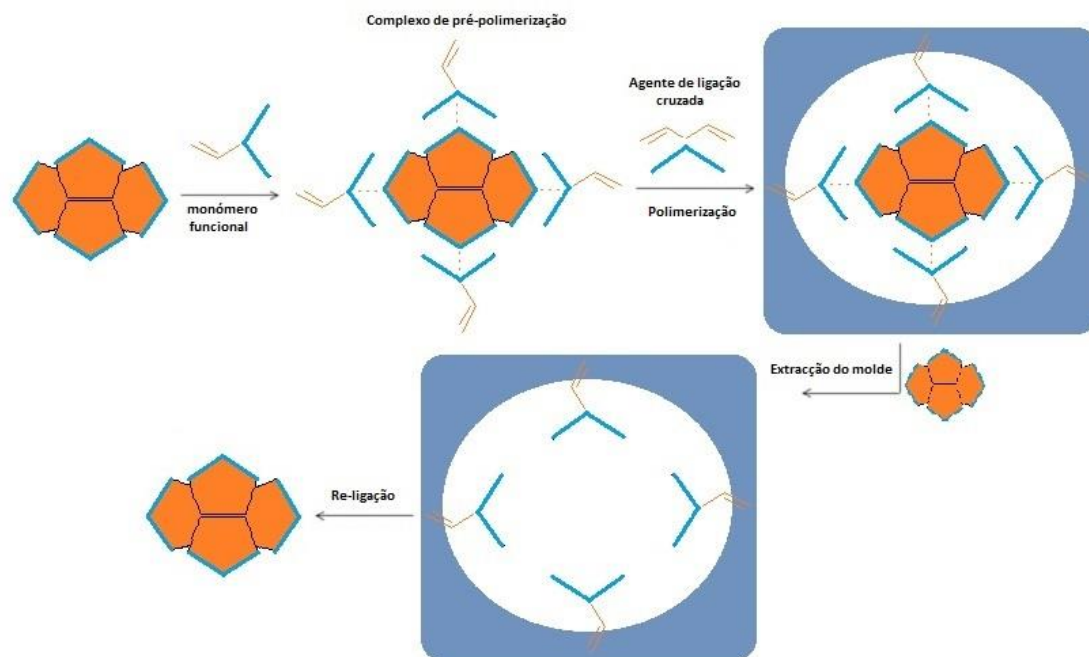


Figura 1.4. Representação esquemática do processo de impressão molecular.

De uma forma geral, a impressão molecular é uma técnica promissora de atribuição de reconhecimento molecular pré-determinado para materiais adequados que podem reconhecer, e em alguns casos responder, a agentes químicos e biológicos, provando ser de grande utilidade para o desenvolvimento de sensores [45, 46]. Os MIPs apresentam vantagens como especificidade, possibilidade de reutilização (sem perda de performance), fácil preparação, relação custo-eficácia, estabilidade e seletividade molecular [44, 45, 47, 48]. Exibem ainda elevada resistência a condições extremas, como temperaturas elevadas e pressões, ambientes ácidos, básicos, iões metálicos e solventes orgânicos [40, 47, 51, 52].

Atualmente, os materiais MIP já detêm uma grande eficiência para o reconhecimento/captura de biomoléculas de baixo peso molecular, como aminoácidos, antibióticos, pesticidas, pequenos contaminantes ambientais e alimentares, etc. [39]. A impressão de biomacromoléculas como proteínas não é porém tão comum, face às limitações técnicas associadas à sua grande dimensão molecular, que limita a difusão da biomolécula na rede polimérica, à sua reduzida estabilidade química nas condições de formação do polímero, que altera a forma do molde a ser impresso, e à sua grande complexidade estrutural, que dificulta a criação de locais de reconhecimento específicos [43].

Com o decorrer das últimas décadas, houve um desenvolvimento de vários formatos de polímeros e métodos de polimerização, que permitem alargar a gama de aplicações da técnica

de impressão molecular. Esses métodos devem, porém, ser ajustados às necessidades específicas da impressão de proteínas.

1.4.1. Especificidades das proteínas

As proteínas são biopolímeros de aminoácidos, com uma estrutura molecular altamente organizada, resultante da orientação espacial ordenada da sequência de aminoácidos, segundo interações eletrostáticas envolventes. São tridimensionalmente flexíveis e compostas por fendas e cavidades, com uma enorme diversidade de grupos funcionais. Do ponto de vista biológico, as proteínas interagem com outras biomoléculas, de maior ou menor dimensão, através de formação de par iônico, ligações de hidrogénio ou interações hidrofóbicas não-covalentes.

Mas o processo de impressão proteica é composto por várias fases que podem impor transformações profundas na estrutura terciária da proteína, como a ligação do modelo, a remoção do modelo e a subsequente religação. No entanto, não é necessário que a proteína bio-impressa reconheça totalmente a estrutura modelo. A interação entre uma parte limitada da proteína (local de ligação) e uma parte limitada do biopolímero é suficiente para iniciar o reconhecimento molecular.

Efetivamente, uma impressão de proteínas bem sucedida é uma chave que abrirá inúmeras possibilidades na biologia molecular, na medicina e na biotecnologia [39]. Descrevem-se de seguida as técnicas mais comuns na preparação de materiais MIP, no sentido de se identificar a melhor estratégia para a impressão de CEA.

1.4.2. Síntese

A síntese de MIPs decorre na presença de monómeros funcionais, moléculas modelo e agentes de ligação cruzada, por métodos covalentes e não-covalentes. A remoção das moléculas modelo do material polimerizado dá lugar à formação dos locais de ligação com propriedades de reconhecimento molecular. Estes materiais apresentam, por isso, cavidades que detêm tamanho, forma e grupos funcionais orientados, complementares à molécula modelo, permitindo a religação orientada do modelo impresso [48-50]. A presença desta orientação da ligação é muitas vezes aferida por comparação do material impresso com outro não impresso (NIP - *non-imprinted polymer*), fabricado de modo análogo mas na ausência do modelo [47].

De uma forma geral, os métodos de maior eficiência na obtenção de materiais MIP para inclusão em sensores biomiméticos, são a polimerização em *bulk* e a polimerização em superfície [41], descritas de seguida.

A polimerização em bulk consiste na adição consecutiva do modelo, do monómero, do solvente, do agente de ligação cruzada e do iniciador (Figura 1.5). A polimerização é tipicamente desencadeada por um iniciador radicalar, pelo que se torna necessária a remoção de oxigénio do meio de polimerização. A indução da polimerização é muitas vezes realizada por aquecimento ou por radiação, tendo em vista o elevado rendimento da reação. O produto resultante é um sólido, rígido, que é pulverizado, peneirado e sujeito a remoção do modelo. A impressão em *bulk* tem a vantagem de ser um processo tecnicamente muito simples, que permite a produção em grande escala de uma matriz polimérica, muito estável e de baixo custo [41], permitindo a inclusão de uma grande variedade de grupos funcionais. As cavidades responsáveis pela re-ligação do modelo são, porém, muitas vezes irregulares em forma e tamanho, promovendo a existência de múltiplos locais de ligação com afinidades diferentes para um mesmo modelo. Além disso, muitas das cavidades de ligação são destruídas durante a pulverização [41, 53].



Figura 1.5. Polimerização em *bulk*.

A aplicação concreta da impressão em *bulk* na preparação de materiais MIP para proteínas tem várias limitações técnicas associadas: a manutenção da estrutura 3D da proteína a imprimir não é compatível com o aquecimento do meio onde a reação ocorre; o grande tamanho da proteína dificulta a remoção de algumas espécies impressas, que ficam por isso aprisionadas no polímero; e o processo em geral requer grandes quantidades do modelo, o que normalmente é incompatível com o elevado custo das proteínas. Uma alternativa a este processo é a polimerização em superfície.

A impressão em superfície diz respeito à construção de locais de ligação de um modelo impresso, realizada numa superfície recetora. O primeiro passo neste processo consiste na

ligação do modelo a uma superfície, por ligação covalente ou não covalente. O passo seguinte é a polimerização do espaço envolvente com um filme polimérico apropriado. A remoção do modelo conclui o processo, libertando os locais para os quais o modelo deve apresentar elevada afinidade.

A impressão em superfície é especialmente adequada à impressão de grandes biomoléculas, tais como proteínas, uma vez que a sua grande dimensão permite a construção de polímero de grande controlo estrutural. A remoção das proteínas é também facilitada, comparativamente aos processos *bulk*, uma vez que o modelo se encontra acessível, na superfície externa.

1.4.3. Recetores sintéticos *versus* naturais

Tendo em conta as várias décadas de estudo já dedicadas à obtenção de materiais MIP, é possível hoje estabelecer uma análise comparativa fiel entre os anticorpos naturais, obtidos muitas vezes por processos que envolvem o recurso a animais, e os seus análogos biomiméticos. As vantagens e desvantagens destes materiais encontram-se listadas na tabela 1.3 [39].

A comparação desses materiais deixa antever que nenhum destes será um sistema perfeito para o reconhecimento molecular. Considerando, porém, que o objetivo deste trabalho é o desenvolvimento de sistemas analíticos com aplicação em contexto POC, aspetos como custo e estabilidade assumem uma especial importância, fazendo com que a utilização de materiais MIP neste contexto possa ser efetivamente favorável.

Tabela 1.3. Comparação entre anticorpos naturais e sintéticos (MIPs) [37, 39].

| Anticorpos naturais | MIPs |
|---|--|
| Baixa estabilidade química | Elevada estabilidade (a baixos/elevados pHs e temperatura) |
| Elevado custo | Baixo custo e fácil preparação |
| Fraco desempenho no meio não-aquoso | Podem atuar em solventes orgânicos |
| Com diferentes requisitos operacionais (pH, força iónica, temperatura, substrato) | Com requisitos operacionais mínimos |
| Existem para um número limitado de analitos | Podem ser preparados praticamente para qualquer composto |
| Alta afinidade/especificidade | Afinidade variável (especialmente para modelos macromoleculares) |
| Armazenamento de baixa duração à temperatura ambiente | Armazenamento com longa duração, sem perda de desempenho |

Por fim, é ainda importante considerar que a obtenção de materiais MIP para proteínas deverá basear-se em processos de polimerização em superfície e que este é especialmente atrativo para a aplicação de biossensores com materiais biomiméticos, sendo compatível com a monitorização de propriedades elétricas, óticas, térmicas e de massa [39, 42].

1.5. Biossensores

Os biossensores são dispositivos analíticos que compõem um elemento sensor (anticorpo, enzima, célula, material biomimético, etc.) biológico ou biologicamente derivado, que está integrado ou intimamente associado a um transdutor físico-químico (eletroquímico, ótico, piezoelétrico, etc) [39], oferecendo várias vantagens como baixo custo, versatilidade, boa sensibilidade e seletividade [56]. O esquema geral de funcionamento do biossensor pode ser visualizado na Figura 1.6.

De uma forma simples, os biossensores compreendem dois componentes: (i) o elemento de reconhecimento, que é um material sensor que liga seletivamente o analito alvo ao biossensor; e (ii) o sistema de transdução, que pode converter esta interação (alterações químicas) num sinal elétrico relacionado com a concentração ou grupo de analitos na amostra. [51, 55].

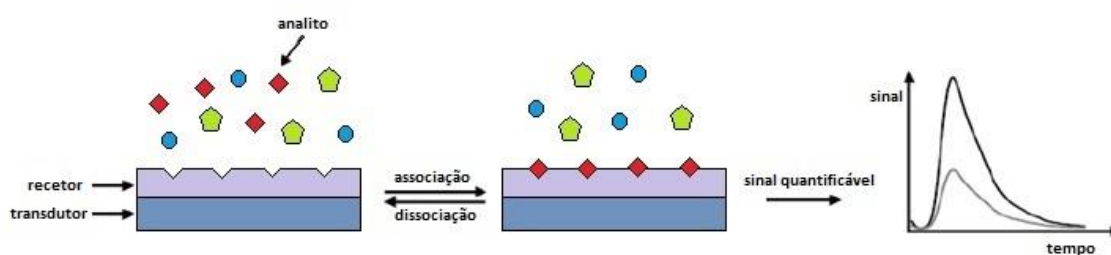


Figura 1.6. Representação esquemática de um biossensor.

1.5.1. Elemento de reconhecimento

São vários os tipos de elementos de reconhecimento utilizados em biossensores. De uma forma geral, estes elementos têm como objetivo principal estabelecer uma ligação seletiva e sensível ao composto alvo, de forma direta ou indireta, podendo ser de natureza biológica ou sintética. Os elementos mais utilizados para biomoléculas de interesse clínico são os anticorpos naturais. No contexto do presente trabalho são ainda de enorme relevância os materiais biomiméticos ou anticorpos plásticos (quando o composto alvo é uma proteína).

Os anticorpos naturais desempenham no biossensor um papel análogo aos imunoensaios convencionais, como é o caso dos ensaios tipo ELISA. É por este motivo que os biossensores com anticorpos naturais são também vulgarmente reconhecidos como imunossensores. Nos imunossensores o reconhecimento molecular baseia-se na formação de complexos estáveis antígeno-anticorpo [7, 56, 59].

Os anticorpos sintéticos correspondem aos materiais molecularmente impressos, desenhados das formas mais diversas. O processo mais utilizado no contexto da deteção de proteínas baseia-se na impressão em superfície, na qual a proteína modelo é ligada diretamente à superfície transdutora. A polimerização é desencadeada por um estímulo químico ou elétrico (ou radiação) e a remoção do modelo é concretizada por ação química ou bioquímica.

1.5.2. Transdução

Independentemente do tipo de elemento de reconhecimento, o sistema de transdução pode ser ótico, de massa ou eletroquímico. Os mais extensivamente utilizados são os biossensores eletroquímicos, devido às inúmeras vantagens que se lhe associam, nomeadamente baixo custo, simplicidade, fácil utilização, elevada seletividade, boa estabilidade, alta sensibilidade, elevada rapidez e possível portabilidade.

Nos biossensores eletroquímicos, o transdutor é um eletrodo baseado num material condutor, de metal, de carbono, de filme polimérico ou de óxidos inorgânicos. Incluem-se aqui grafeno, carbono vítreo, nanotubos de carbono, diamante, ouro, platina, ITO, etc. No essencial, este material deve permitir uma ancoragem adequada do elemento de reconhecimento e originar leituras estáveis e sensíveis.

No contexto particular dos biossensores com materiais biomiméticos, a transdução elétrica permite que a fase de polimerização seja iniciada por um estímulo elétrico, dando lugar assim a um processo de electropolimerização. Este tipo de polimerização oferece a vantagem de

permitir um controlo mais rigoroso do curso da polimerização, mediante seleção dos parâmetros eletroquímicos adequados [71].

De acordo com a propriedade medida, os biossensores eletroquímicos podem ser subdivididos em potenciométricos, amperométricos, voltamétricos ou impedimétricos [39, 57], conforme a entidade medida é potencial, corrente, corrente *versus* potencial ou impedância. Os mais utilizados serão os voltamétricos, embora as medidas com impedância tenham vindo a assumir um papel crescente, por permitirem estabelecer medidas *label-free*. Os sensores potenciométricos são talvez os menos utilizados na detecção de proteínas em POC, mas constituem ferramentas analíticas de grande potencial, uma vez que os materiais/equipamentos envolvidos são de baixo custo, prontamente disponíveis, e que a interação com a amostra é feita através de uma membrana seletiva, característica que promove a seletividade da determinação [64, 65].

1.6. Potenciometria

A potenciometria é um método eletroquímico que envolve a determinação da diferença de potencial (equação 1.1) entre um eléctrodo indicador e um de referência, ou entre dois eléctrodos de referência separados por uma membrana de permeabilidade seletiva, quando não houver corrente significativa (próxima do zero – método estático) a fluir entre eles (Figura 1.7).

$$E_{\text{cel}} = E_{\text{ref}} - E_{\text{ind}} \quad (1.1)$$

O eléctrodo indicador pode ser um eléctrodo seletivo de ião (ESI, em inglês *ion-selective electrode*), que é um sensor eletroquímico com base em finos filmes ou membranas seletivas e que contém ionóforos como elemento de reconhecimento. A aplicação mais comum deste método está na base dos eléctrodos de pH, mas existem outros eléctrodos seletivos a outras espécies iónicas (F^- , I^- , Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , NH_4^+) ou gases (CO_2 , NH_3).

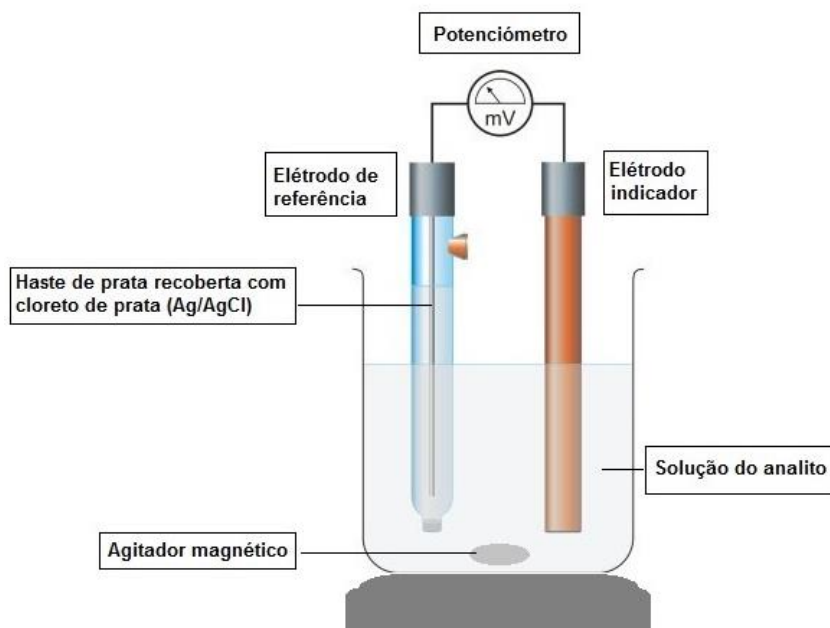


Figura 1.7. Célula eletroquímica com análise da potenciométrica com recurso a um ESI.

De uma forma geral, há vários aspetos particulares da técnica potenciométrica, desde os eletrodos envolvidos ao desempenho analítico dos mesmos, que devem ser focados no contexto da aplicação de biossensores com materiais biomiméticos na transdução potenciométrica.

1.6.1. Eletrodos

O eléctrodo de referência deve manter um valor de potencial constante e estável, uma vez que serve de comparação ao eléctrodo indicador. Além disso, o eléctrodo de referência ideal, deve (i) ser reversível; (ii) retomar o valor de potencial original após submetido a pequenas correntes; (iii) exibir baixa histerese, i.e., baixa variação de potencial com as variações de temperatura, regressando ao valor inicial após o restabelecimento da temperatura inicial; (iv) e não deve polarizar, de modo a fornecer um valor de potencial que é independente da corrente que passe.

O eléctrodo de referência mais utilizado é o de AgCl/Ag, face à sua simplicidade, potencial constante e baixo custo de produção. É constituído por um fio de prata com revestimento eletrolítico de uma fina camada de cloreto de prata, imerso numa solução de cloreto de potássio (KCl) saturado com cloreto de prata (AgCl) [62, 63]. A concentração de cloreto na solução é a condição responsável pelo potencial de eléctrodo, uma vez que esta espécie vai condicionar a concentração de Ag^+ presente, que por sua vez será a responsável pelo valor de potencial do eléctrodo. Dada a importância da concentração de cloreto na solução de KCl/AgCl, alguns eléctrodos de referência são construídos com uma dupla junção. Esta dupla

ponte salina está associada à presença de um segundo compartimento externo, que evita que diferenças de pressão osmótica e de concentração iónica entre a solução de medida e a solução de KCl/AgCl se possam fazer sentir.

O *eléctrodo indicador* é aquele cujo potencial depende da atividade da espécie eletroativa. O eléctrodo indicador ideal é aquele que, para uma pequena variação de concentração do analito, promove uma grande variação na diferença de potencial, dentro dos valores teoricamente esperados. Além disso, o eléctrodo indicador ideal deve apresentar (i) um alto grau de reprodutibilidade; (ii) uma grande seletividade; (iii) uma resposta rápida à variação da concentração da espécie.

Os eléctrodos indicadores mais comuns são os eléctrodos seletivos de ião (ESIs) [62, 63]. Estes eléctrodos apresentam uma membrana seletiva que permite discriminar seletivamente uma determinada espécie iónica. O potencial interno da membrana pode ser estabelecido através de um contacto sólido ou líquido. O contacto líquido implica a colocação da membrana entre dois compartimentos líquidos: a solução da amostra e a solução de referência interna, tipicamente uma solução do ião a medir, na qual se mergulha um fio de prata que serve de contacto eléctrico. O contacto sólido implica a deposição da membrana sobre um suporte sólido condutor, tipicamente ouro ou carbono (na Figura 1.8 apresenta-se a imagem dos eléctrodos utilizados neste trabalho, onde o contacto sólido é estabelecido por meio de grafite e cola). Uma vez seca, esta membrana contacta com a solução da amostra por um lado e com o contacto eléctrodo sólido por outro.



Figura 1.8. Eléctrodo seletivo de ião.

Embora os eléctrodos seletivos de ião de contacto líquido permitam uma manipulação mais eficaz das características de funcionamento dos eléctrodos, como o limite de deteção, os eléctrodos de contacto sólido são mais eficazes para medidas no local, uma vez que a manipulação dos eléctrodos não requer cuidados especiais.

1.6.2. Base teórica

De acordo com as recomendações da *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC), a diferença de potencial da célula eletroquímica de um ESI é linearmente dependente do logaritmo da atividade do íon alvo na solução, de acordo com a equação de *Nernst-Nicolski* (equação 1.2) [65], na qual ΔE corresponde à força eletromotriz (f.e.m.) de uma célula eletroquímica, definida como sendo a diferença de potencial do ESI e do eletrodo de referência; R é a constante universal dos gases ($8.314 \text{ J/(K}\times\text{mol)}$); T é a temperatura em Kelvin; F é a constante de Faraday ($9.6485\times 10^4 \text{ C/mol}$); z_A é a carga do íon principal, A ; a_A é a atividade do íon A expressa em mol/L ou mol/kg; e “constante” corresponde ao valor de f.e.m. que inclui o potencial normal do ESI, do eletrodo de referência e da junção líquida, expressa em mV.

$$\Delta E = \text{"constante"} + \frac{2.303 RT}{z_A F} \log a_A, \quad (1.2)$$

A equação 1.2 tem por base a atividade, “ a ”, em vez da concentração, “ c ”, da espécie iônica a medir presente na solução. O cálculo de atividade implica porém a identificação de alguns parâmetros, tais como o “tamanho iônico” do íon específico da solução de ensaio, cujo valor é desconhecido para a maioria das espécies iônicas de caráter orgânico em solução aquosa. Considerando que a substituição de “ a ” por “ c ” é possível em condições de força iônica ajustada, as medidas potenciométricas são realizadas num valor de força iônica, I (equação 1.3) fixado a um valor elevado e constante.

$$I = \frac{1}{2} \sum_i c_i z_i^2 \quad (1.3)$$

De uma forma simples, a força iônica corresponde à intensidade do campo elétrico na presença dos íons em solução, considerando c_i : concentração do íon, expressa em mol/L; e z_i : carga desse íon [68].

1.6.3. Curva de calibração

A curva de calibração corresponde ao traçado gráfico do logaritmo c da concentração de um íon alvo em função da f.e.m. da célula eletroquímica. A partir da análise da curva de calibração (Figura 1.9), é possível obter informações tais como o limite de detecção (LD), limite inferior de resposta linear (LIRL) e declive.

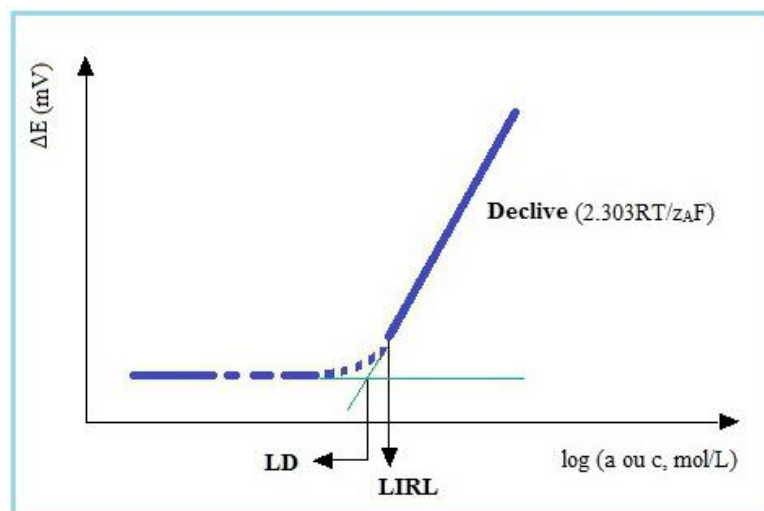


Figura 1.9. Curva de calibração de um ESI. (— — —): sem variação nítida de potencial durante a variação da atividade a ou concentração c do ião alvo; (— — —): pequena variação de potencial com a variação de a ou c , sem corresponder ao esperado pela equação modificada de *Nernst-Nicolski*; (—): resposta linear do potencial com a variação de a ou c , previsto na equação modificada de *Nernst-Nicolski*.

O LD é definido como a concentração de um ião alvo no ponto de interseção entre dois segmentos de reta extrapolados. O comportamento linear a partir de uma dada concentração de um ião alvo é designado como LIRL. O declive resultante da curva de calibração demonstra a sensibilidade da célula, bem como a sua qualidade em termos de resposta. O valor teórico de declive experimental sob condições normais de pressão e temperatura deverá ser igual a $59.16/z_A$ mV/década [68, 69].

É importante referir que a calibração de elétrodos seletivos novos deve ser realizada repetidamente e em dias diferentes, a fim de comparar o desempenho dos elétrodos com maior exatidão. Através destes resultados, é possível determinar as características analíticas do ESI, tais como o tempo e a seletividade da resposta potenciométrica provenientes da capacidade da membrana. A sua descrição aprofundada encontra-se nas recomendações da IUPAC, 1993 [60].

1.6.4. Tempo de resposta

O tempo de resposta corresponde ao período de tempo durante o qual o eléctrodo de referência e o ESI estão em contacto com uma amostra de solução com o ião alvo, ou em que a ou c do ião em solução é alterada, e o primeiro instante no qual o declive $\Delta E/\Delta t$ iguala o valor limite seleccionado (Δt), de acordo com a Figura 1.10.

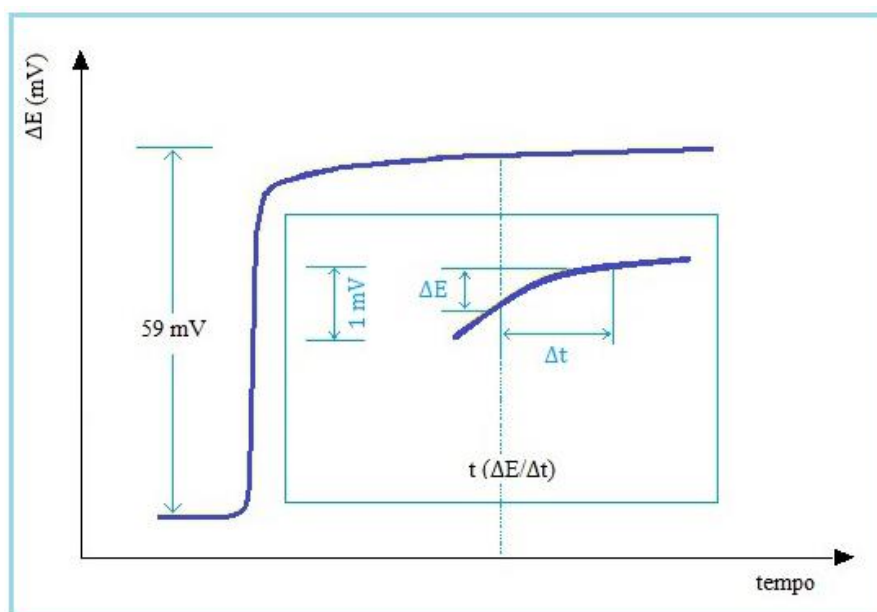


Figura 1.10. Representação gráfica do tempo de resposta t , ($\Delta E/\Delta t$).

A escolha do valor limite advém de questões de ordem experimental ou da exatidão desejada para a leitura potenciométrica. O tempo de resposta dos ESIs depende, geralmente, da concentração absoluta presente na solução, bem como da variação de c do ião ($c_{\text{inicial}} - c_{\text{final}}$) incorporada no sistema [68, 69].

1.6.5. *Drift*

O *drift* corresponde a uma mudança lenta e não aleatória da diferença de potencial da célula ESI ao longo do tempo, numa solução com temperatura e composição constante. A determinação do *drift* é efetuada através de uma curva linear com encaixe no conjunto de dados recolhidos durante um determinado período de tempo numa solução. O declive da linha do potencial *versus* tempo é denominado *drift*. Os desvios aleatórios de potencial em torno da linha definem o desvio-padrão dos dados medidos [68, 69].

1.6.6. *Efeito de pH*

De uma forma geral, os ESIs têm a capacidade de detetar um ião seletivamente, mas outros iões que coexistam na amostra podem ter a capacidade de alterar a resposta

potenciométrica, atuando como interferentes. Os intervenientes habituais nestas soluções são o protão e o anião hidroxilo, que afetam diretamente a resposta da membrana seletiva bem como a carga da proteína, já que o seu grau de ionização é fortemente alterado com o pH.

É, por isso, de extrema importância utilizar soluções padrão de ajuste de pH, optando por ter sempre um mesmo valor de pH com o intuito de minimizar as interferências na resposta potenciométrica, através do controlo da atividade dos iões H^+ e HO^- e da força iónica.

A gama de valores de pH a escolher para a calibração pode ser determinada por curvas de calibração efetuadas em diferentes valores de pH, ou pelo traçado de diagramas de *Reilley*, onde o valor de potencial é monitorizado continuamente face à variação de pH da solução.

Além do estudo do efeito do pH, são necessários estudos mais profundos de seletividade a fim de verificar a capacidade do ESI discriminar o ião para o qual é seletivo quando na presença de outros iões [68, 70].

1.6.7. Seletividade

A seletividade de um complexo potenciométrico traduz a sua capacidade de distinção, em solução, do ião para o qual o ESI é seletivo. A equação modificada de *Nikolski-Eisenman* (equação 1.4) expressa o potencial de um ESI numa solução que contém o ião principal, A, e o ião interferente, B, em que E é o valor experimental do potencial do ESI; R a constante dos gases perfeitos ($8.3144 \text{ J/(K}\times\text{mol)}$); T a temperatura termodinâmica em Kelvin; F a constante de Faraday ($9.6485\times 10^4 \text{ C/mol}$); a_A a atividade do ião interferente, expressa em mol/L ou mol/kg; z_A a carga do ião principal, A; z_B a carga do ião interferente, B; “constante” o potencial de junção líquida, expressa em mV e $K_{A,B}^{pot}$ é o coeficiente de seletividade potenciométrica do ião interferente.

$$E = \text{"constante"} + \frac{2.303 RT}{z_A F} * \log [a_A + \sum_i K_{A,B}^{pot} [a_{Bi}]^{\frac{z_A}{z_{Bi}}}] \quad (1.4)$$

Os coeficientes de seletividade podem ser calculados através de diversos métodos, tais como:

- **Método de interferência fixada:** Em soluções com variação da atividade do ião principal e atividade constante dos iões interferentes, é calculada a diferença de potencial entre o eletrodo de referência e o ESI. Através da seguinte expressão, é possível determinar o coeficiente de seletividade potenciométrico:

$$K_{A,B}^{pot} = \frac{a_A}{a_B^{z_A/z_B}} \quad (1.5)$$

- **Método das soluções separadas:** Neste caso, há preparação de uma solução que contém apenas o íon principal, com uma atividade a_A , na qual se mede a diferença de potencial E_A . Ao mesmo tempo é preparada uma outra solução que contém somente o íon interferente (a_B), em que $a_A=a_B$ e da qual se regista também a diferença de potencial E_B . O coeficiente de seletividade é determinado a partir da seguinte equação:

$$\log K_{A,B}^{pot} = \frac{(E_B - E_A) z_A F}{a_B^{z_A/z_B}} + \left[1 - \frac{z_A}{z_B} \log a_A \right] \quad (1.6)$$

- **Matched potential:** Em soluções com condições semelhantes, é determinada a razão entre as atividades do íon interferente e do íon principal, que produzem igual variação de potencial. Através da equação 1.7 é calculado o valor do coeficiente de seletividade potenciométrico:

$$K_{A,B}^{pot} = \frac{a'_A - a_A}{a_B} \quad (1.7)$$

De uma forma geral, o cálculo do coeficiente de seletividade potenciométrico é baseado na equação de *Nernst-Nicolski* no caso do método de interferência fixada e das soluções separadas. Este conceito encontra-se porém associado a algumas limitações, tais como (i) capacidade do íon interferente igualar o potencial do íon principal; (ii) gerar valores anómalos de coeficiente de seletividade potenciométrico apenas porque a carga do íon principal é muito diferente; (ii) dificuldade em obter uma resposta *Nernstiana* dos elétrodos para o íon interferente.

De acordo com a IUPAC, 1995, o método recomendado para a determinação do coeficiente de seletividade potenciométrico é o *matched potential*, pela sua simplicidade nos cálculos e facilidade de realização. Os resultados obtidos servirão apenas como indicação para o grau de seletividade dos ESIs [68, 70].

Neste sentido, o trabalho a seguir descrito tem como objetivo o fabrico de um sensor potenciométrico para CEA, com recurso a membranas seletivas compostas por material sensor do tipo MIP. Este material foi criado a partir de métodos de impressão em superfície por eletropolimerização de monómeros adequados sobre vidro FTO (*Fluorine-Tin-Oxide*).

2. Descrição Experimental

O trabalho proposto consiste no desenvolvimento de uma metodologia rápida e de baixo custo para o doseamento do CEA, através da sintetização de material sensor e a sua utilização na construção de um biossensor. Ao longo do capítulo são abordadas as metodologias envolvidas na síntese do material sensor e construção do biossensor, avaliação do desempenho analítico dos dispositivos obtidos e aplicação analítica em urina real dopada.

2.1. Reagentes e soluções

Todos os reagentes utilizados foram de qualidade *p.a.*, sem qualquer purificação adicional. Listam-se de seguida os reagentes utilizados neste trabalho e a sua origem comercial: Anilina (99,5%), Poli(cloreto de vinilo) (do inglês *poly(vinyl chloride)*, PVC) de elevado peso molecular, tampão fosfato salino (do inglês *Phosphate Buffered Saline*, PBS, com pH=7,4), Tetrahidrofurano (THF, 99%), Ácido sulfúrico (H₂SO₄, ~96%), *o*-Nitrofenilolil éter (do inglês, *o-Nitrophenyl octyl ether*, oNPOE, 99%), Ácido 4-(2-Hidroxietil)piperazino-1-etanosulfónico (HEPES, 99,5%), todos comercializados pela Sigma-Aldrich; Cloreto de vinilbenziltrimetilamónio (VB, 97%), e Brometo de *p*-tetraoctilamónio (TOB, 98%) comercializados pela Acros Organics; *o*-Fenilenodiamina (OPD, 98%) comercializado pela Tokyo Chemical Industry; Antigénio carcinoembrionário (do inglês, *carcinoembryonic antigen*, CEA, de fluidos humanos), comercializado pela Sigma-Aldrich; e Tripsina (TP), comercializada pela Reagente 5.

As soluções aquosas de maior concentração foram preparadas por medição rigorosa (pesagem ou volume) dos reagentes correspondentes. As soluções mais diluídas foram preparadas por diluição rigorosa das soluções anteriores. Em concreto, as soluções padrão de $2,50 \times 10^{-2}$ µg/mL de CEA foram preparadas em solução tampão por diluição rigorosa do material obtido comercialmente. Os padrões de CEA menos concentrados foram preparados por diluição rigorosa da solução anterior, também em solução tampão. Esta solução tampão era de

HEPES, com uma concentração igual a $1,0 \times 10^{-2}$ mol/L. O pH desta solução foi alterado pela adição de quantidades adequadas de ácido clorídrico concentrado ou de solução saturada de hidróxido de sódio. O efeito interferência da composição geral da amostra de urina no comportamento dos elétrodos requereu a utilização de uma solução de $2,50 \times 10^{-2}$ µg/mL de CEA preparada em solução tampão de pH 4.4, adicionada de urina real de indivíduo saudável, diluída dez vezes em HEPES.

2.2. Material e aparelhos utilizados

Todas as soluções de concentração rigorosa foram preparadas em balões volumétricos de classe A, com 5,00, 10,00, 200,00, 250,00 e 500,00 mL de capacidade total, ou em tubos *epENDORF* (de 1,0 ou 2,0 mL) através da medição rigorosa de volumes da ordem dos µL. Na medição destes volumes foram utilizadas pipetas automáticas de volume regulável, VWR 1 – 5 mL; BioHit, entre 2 – 20 µL, 20 - 200 µL, 100 – 1000 µL; e Eppendorf, entre 0,1 – 2,5 µL. As pesagens dos reagentes foram efetuadas na balança RADWAG XA 110/X, com uma precisão de $\pm 0,0001$ g.

Quando necessário, recorreu-se ao banho de ultrassons termostatizado, BANDELIN Sonorex Digitec, tendo em vista minimizar o tempo envolvido na dissolução de substâncias sólidas. Em algumas condições, procedeu-se à incubação de soluções em temperatura controlada numa Estufa Selecta, Digitheat. A homogeneização de soluções/suspensões foi realizada em placa de agitação vortex MVOR-03 da SBS e a separação da fração sólida numa centrífuga Labnet, Citomed. A secagem de materiais foi realizada em exsiccador com atmosfera de azoto.

A célula potenciométrica foi constituída pelo eléctrodo indicador e pelo eléctrodo de referência Ag/AgCl, ambos construídos no laboratório. A diferença de potencial entre estes dois elétrodos foi medida em decimilivoltímetro Crison GLP21 (sensibilidade $\pm 0,1$ mV), que continha um agitador magnético acoplado. O sinal de saída do potenciómetro foi ligado a um ponto de comutação com seis saídas, o que permitiu a leitura simultânea de seis elétrodos seletivos (Figura 2.1).

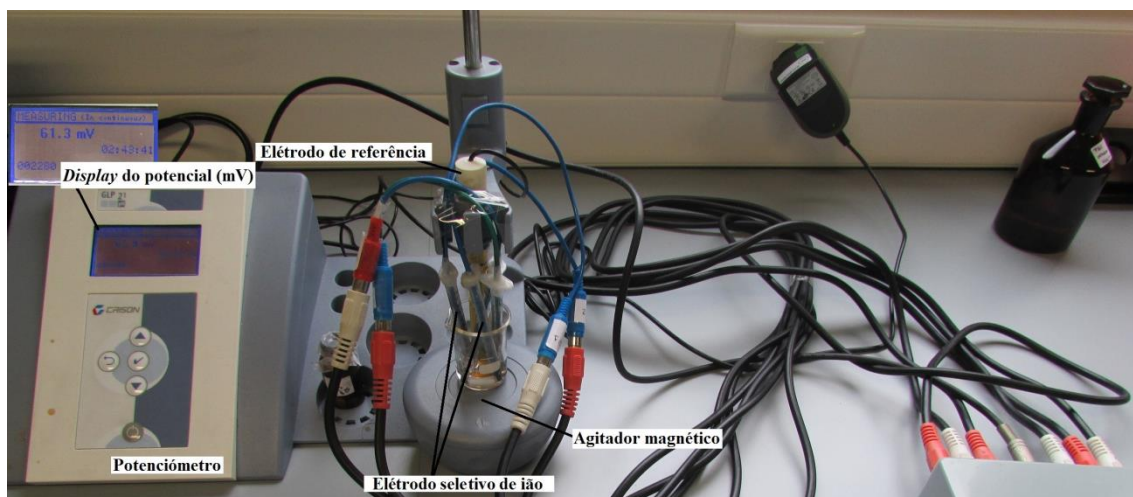


Figura 2.1. Montagem da célula potenciométrica, com equipamento medidor e acessórios (agitador magnético e sistema de leitura múltipla e sequencial de vários ESIs).

A caracterização dos materiais e das membranas dos eléttodos seletivos foi realizada através de um espectrómetro de infravermelho com transformada de Fourier (do inglês *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*, FTIR), da Thermo Scientific, Nicolet iS10, e por espectroscopia de Raman com microscopia confocal, da Thermo Scientific, DXR.

2.3. Preparação do material sensor

A preparação de materiais impressos, MIP, foi realizada de acordo com o procedimento representado na Figura 2.2, tendo-se preparado em paralelo materiais de controlo não impressos, NIPs, recorrendo aos mesmos procedimentos mas na ausência da proteína.

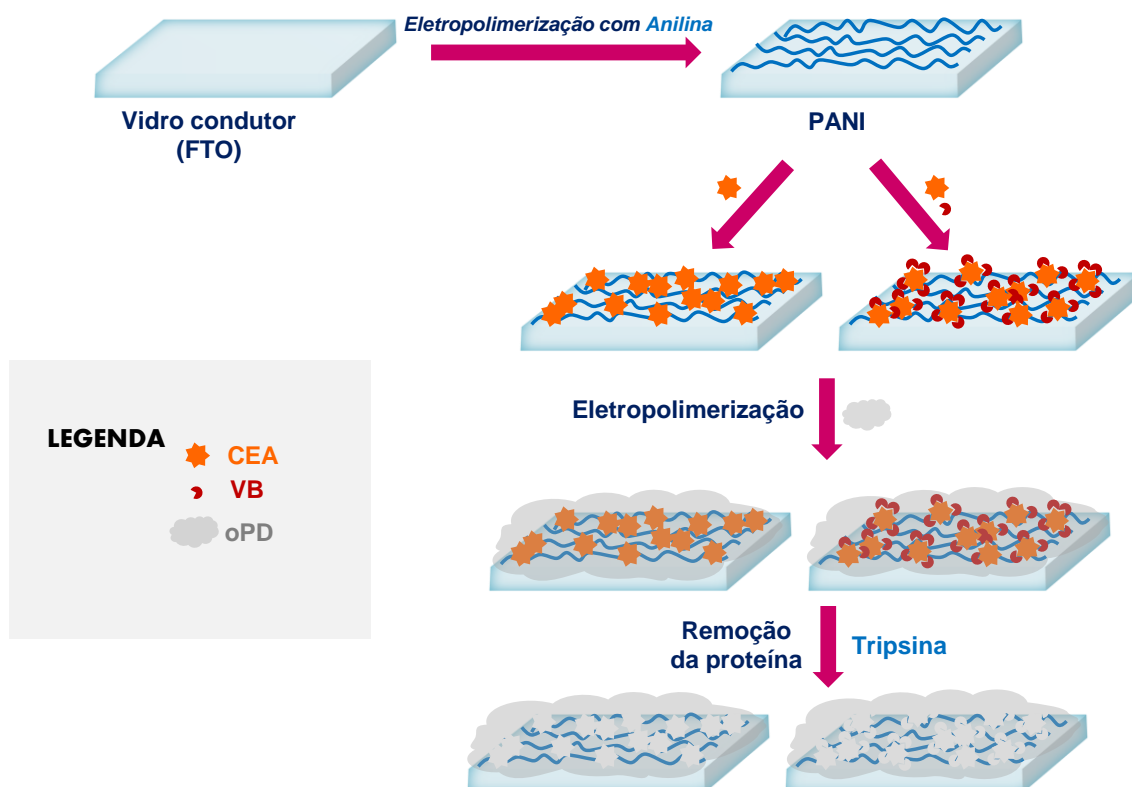


Figura 2.2. Preparação dos MIPs sem e com monómero carregado positivamente (VB).

Em detalhe, o primeiro passo deste procedimento envolveu a preparação de 50 mL de uma solução de anilina e de ácido sulfúrico, com um valor de 0,5 mol/L em ambas as espécies, preparada em água ultra pura. A mistura resultante foi colocada em placa de agitação *Vortex*, por alguns minutos, tendo em vista a homogeneização da solução resultante. Seguidamente, procedeu-se à eletropolimerização da anilina nesta solução por cronoamperometria (1 V por 500 segundos) sobre uma superfície de vidro condutora, utilizada como elétrico de trabalho. O filme obtido apresentou uma coloração azul-arroxeadada e foi adiante designado por PANI. Os vidros foram entretanto secos em estufa, a 55 °C, durante a noite.

O passo seguinte consistiu na incubação de soluções de CEA, com ou sem VB, um monómero carregado positivamente, de concentrações iguais a 0,025 µg/mL (em PBS) e 1×10^{-3} mol/L (em água ultrapura), respetivamente. Estas soluções foram preparadas em *ependorf* (Figura 2.3) e incubadas em frigorífico por 2h.

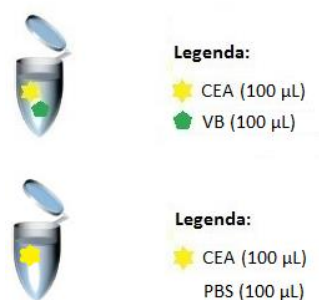


Figura 2.3. Preparação de solução com proteína e monómero carregado e outra com proteína e solução tampão.

Fim do esse período, o conteúdo das soluções nos *ependorf* foi depositado sobre o filme PANI, de acordo com o representado na Figura 2.4, tendo-se realizado ensaios em duplicado. Em paralelo foram preparados outros vidros (Figura 2.5), onde se incubou o filme de PANI em PBS, removendo todo CEA e/ou VB do procedimento. Estes vidros conduziram à preparação de materiais NIP, que serviram de controlo ao processo de impressão. Todos estes vidros foram incubados em frigorífico, sendo posteriormente lavados com PBS e secos à temperatura ambiente.



Figura 2.4. Vidros PANI com solução de proteína com (topo) ou sem (em baixo) monómero carregado positivamente (VB).

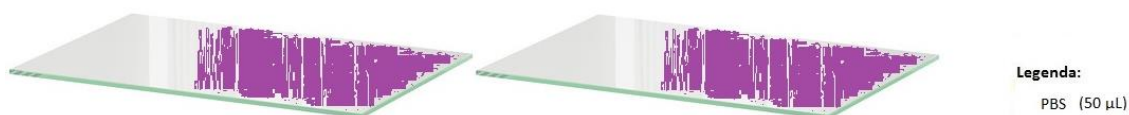


Figura 2.5. Vidros PANI incubados em solução PBS.

De seguida, mergulharam-se os vários tipos de vidro modificado (PANI com CEA, PANI com CEA/VB, e PANI sem CEA/VB), na solução de oPD de concentração igual a 0,0134 mol/L (em água ultrapura). Este monómero foi sujeito a eletropolimerização por cronoamperometria, por aplicação, sobre os vários eléctrodos de vidro modificado, de 1 V por um período de 90 s. No

final da eletropolimerização, os vidros foram lavados e colocados em exsiccador com atmosfera de azoto até ficarem secos.

Por último, todos os vidros foram incubados em solução de tripsina (Figura 2.6), com uma concentração igual a 0,0010 mol/L (em PBS), tendo em vista a remoção da proteína presente nos vidros. A incubação na solução de enzima foi realizada à temperatura ambiente, durante 7h30.

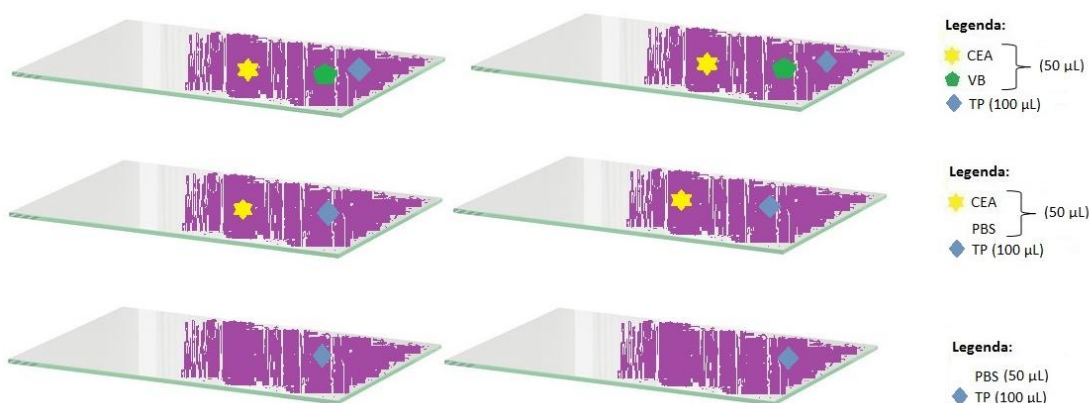


Figura 2.6. Os vários vidros de polianilina modificados e tratados com tripsina.

A remoção da tripsina presente nos vidros foi realizada por lavagem com PBS, seguindo-se a secagem dos vidros em exsiccador com atmosfera de azoto, por 2h30. Na Figura 2.7 apresenta-se o registo fotográfico do aspeto final dos vidros preparados.

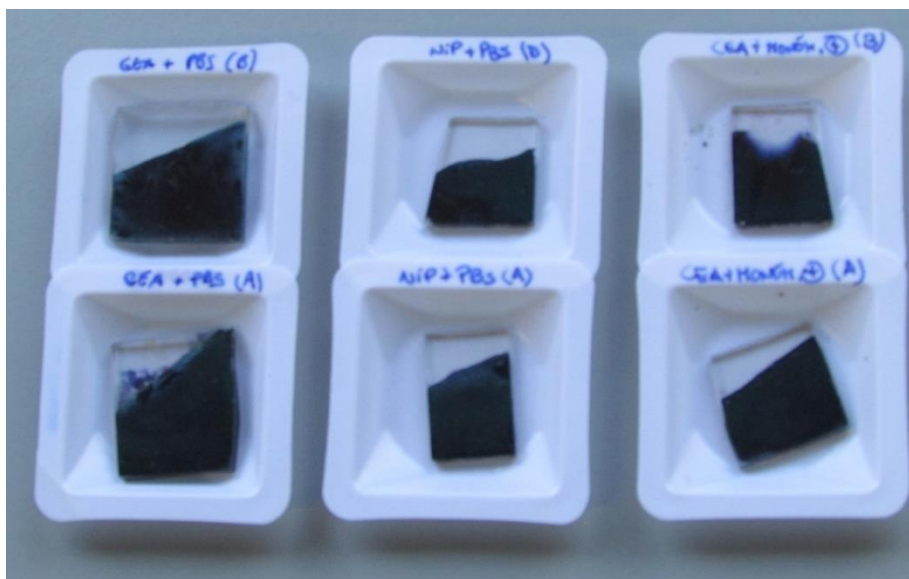


Figura 2.7. Vidros com molde da proteína, sem molde e com monómero carregado (+) e molde.

Procedeu-se entretanto à raspagem de 3 dos 6 vidros, um de cada tipo, e o pó obtido (PANI/CEA-VB/oPD, PANI/CEA/oPD e PANI/oPD) foi armazenado em 3 tubos *eppendorf*, como representado na Figura 2.8. O pó recolhido foi colocado em exsiccador, com atmosfera de azoto, tendo permanecido aí por 24h, para garantir secagem completa.

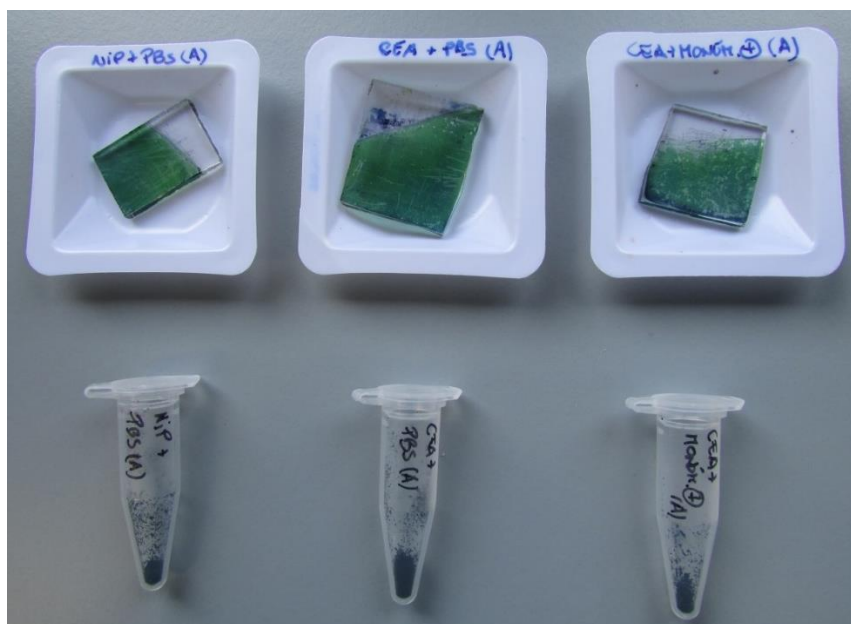


Figura 2.8. Aspeto dos vidros após raspagem do material sensor (PANI-CEA/VB, PANI-CEA e PANI-PBS) e a sua armazenagem em tubos *eppendorf*.

2.4. Preparação das membranas seletivas

Os materiais sensores foram utilizados na preparação de 7 membranas seletivas, de constituição e composição indicadas na tabela 2.1. Cada membrana continha material sensor, MIP ou NIP, solvente mediador plastificante (oNPOE) e PVC. As membranas poderiam ainda conter um aditivo catiónico lipofílico, TOB. Para efeito de controlo, foi ainda preparada uma membrana sem material sensor e com TOB, chamada controlo (+).

As soluções das membranas foram obtidas após pesagem rigorosa das quantidades indicadas na tabela 2.1., seguida de dissolução/suspensão dos materiais referidos em solvente THF, acompanhada de agitação magnética. O aspeto geral das soluções obtidas encontra-se representado na Figura 2.9.

Tabela 2.1. Constituição e composição das membranas seletivas a CEA.

| Material | MIP 1 | MIP 2 | NIP | MIP 1 (+) | MIP 2 (+) | NIP (+) | Controlo (+) |
|------------------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|------------------|----------------|----------------|
| <i>MIP, mg PANI/CEA/oPD</i> | 2,49 2,5% | — | — | 2,8 2,8% | — | — | — |
| <i>MIP, mg PANI/CEA-VB/oPD</i> | — | 1,45 2,5% | — | — | 0,80 2,4% | — | — |
| <i>NIP, mg PANI/oPD</i> | — | — | 1,98 2,5% | — | — | 1,68 2,5% | — |
| <i>Aditivo, mg TOB</i> | — | — | — | 1,68 1,7% | 0,38 1,2% | 0,82 1,2% | 4,2 1,5% |
| <i>Solvente, mg oNPOE</i> | 61,73 61,8% | 36,14 61,0% | 47,24 61,4% | 60,16 60,1% | 18,87 56,2% | 41,63 61,4% | 177,2 61,1% |
| <i>Polímero, mg PVC</i> | 35,59 35,7% | 21,67 36,6% | 27,68 36,0% | 35,39 35,4% | 13,53 (40,3%) | 23,62 34,9% | 108,5 37,4% |

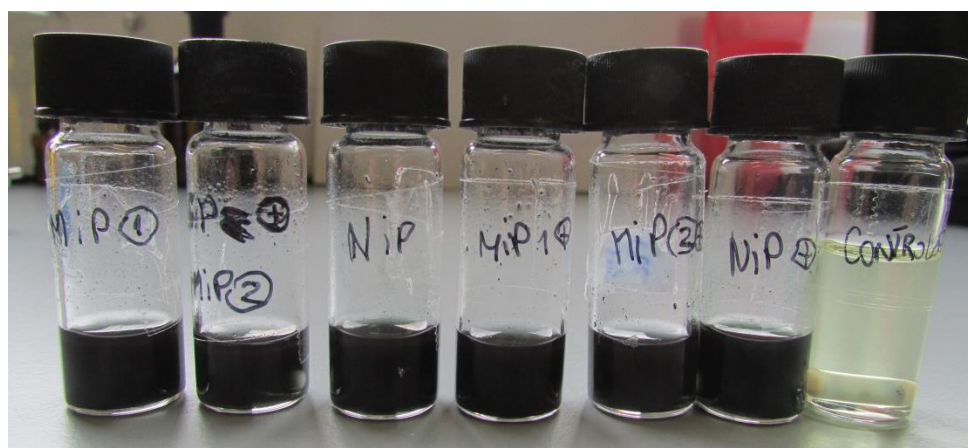


Figura 2.9. Soluções das membranas seletivas de PVC.

Essas soluções de membrana foram depositadas, gota-a-gota, em suportes condutores baseados em grafite para obtenção dos elétrodos seletivos (Figura 2.10). Todos os elétrodos foram preparados em duplicado. O aspeto final das membranas após secagem assume um formato côncavo e pode ser visualizado na Figura 2.11.

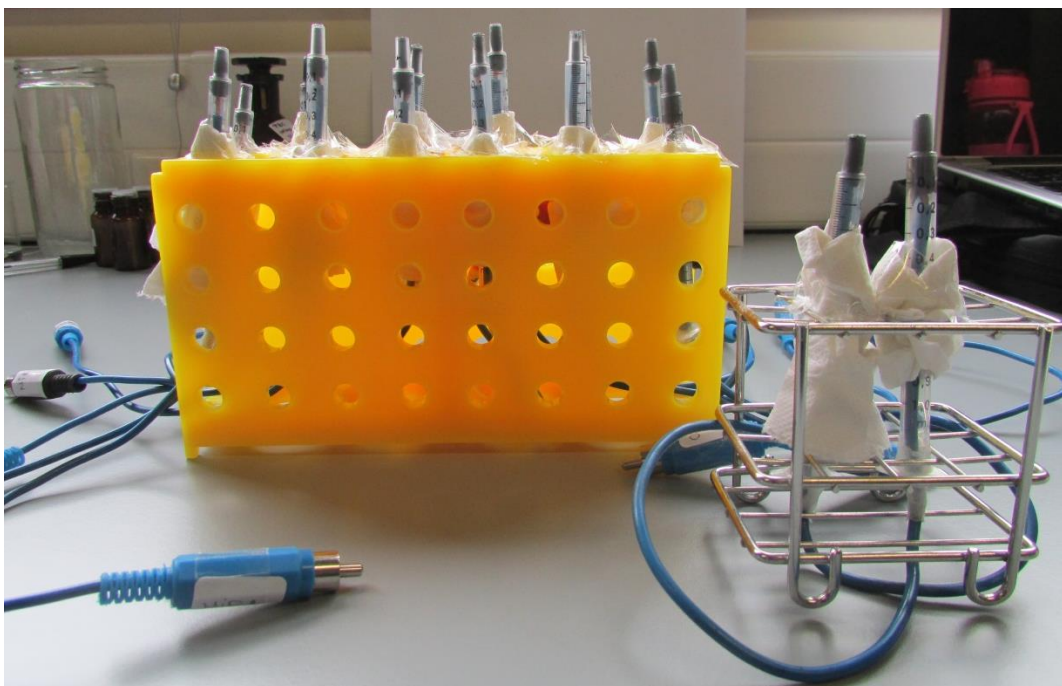


Figura 2.10. Suporte dos ESIs para aplicação das membranas.



Figura 2.11. Membrana seletiva dos ESIs.

Durante o percurso experimental deste trabalho, foi necessária a preparação de novas membranas MIP2 + e controlo +, cuja composição se indica na tabela 2.2. Estes eléctrodos foram tratados da mesma forma que os seus análogos ao longo deste trabalho, uma vez que a sua composição relativa é semelhante.

Os eléctrodos preparados segundo o procedimento descrito são referidos mais adiante pelas designações ESI 1 (MIP1, PANI/CEA/oPD, sem TOB), ESI 2 (MIP2, PANI/CEA-VB/oPD, sem TOB), ESI 3 (NIP, PANI/oPD, sem TOB), ESI 4-6 os correspondentes eléctrodos com TOB, e ESI 7 ao eléctrodo com TOB e sem ionóforo. Antes de utilizar os eléctrodos, as

membranas foram hidratadas e condicionadas em solução de CEA de concentração igual a 3.47×10^{-7} µg/mL de CEA, por um período de 24 h.

Tabela 2.2. Constituição e composição das membranas seletivas a CEA.

| Material | MIP 2+ | Controlo+ |
|------------------------------------|--------------------|--------------------|
| <i>MIP, mg PANI/CEA-VB/oPD</i> | 0,00248 (2,4%) | — |
| <i>Aditivo TOB</i> | 0,00118 (1,1%) | 0,003 (1,1%) |
| <i>Solvente, mg oNPOE</i> | 0,06491 (62,6%) | 0,15529 (58,2%) |
| <i>PVC, mg</i> | 0,03508 (33,8%) | 0,10849 (40,7%) |

2.5. Caraterização dos materiais sensores

A análise pelo FTIR dos materiais sensores foi realizada colocando o material sólido diretamente sobre o cristal de diamante central do acessório de refletância difusa atenuada (do inglês, *Attenuated Diffuse Reflectance*, ATR). Todos os espectros foram colhidos em condições de controlo de temperatura/humidade, e expressaram a média da aquisição consecutiva de 32 espectros. O intervalo de números de onda (eixo x) variou entre 500 e 4000 cm⁻¹ e o sinal obtido (eixo Y) foi representado em % de transmitância. A resolução foi igual a 4000.

A microscopia de Raman foi realizada com um espectrómetro equipado com um laser de 532 nm. A medida foi realizada após exposição de 60 segundos em *photobleaching*, com correção de fluorescência, para 3.5 mW de potência do laser incidente na amostra e 25 µm de abertura *pinhole*, sendo as imagens observadas com lente de 50x.

2.6. Procedimentos de avaliação do desempenho dos eléctrodos

As caraterísticas gerais de funcionamento dos eléctrodos foram avaliadas através da realização de várias curvas de calibração, em meios com diferentes valores de pH (4,3, 4.4, 4.9, 5.8), seguindo para este efeito as recomendações da IUPAC. As leituras potenciométricas foram

realizadas à temperatura ambiente e sob agitação constante, até estabilização. Entre cada procedimento de calibração, os ESIs foram condicionados em água ultra pura.

As curvas de calibração associadas às mesmas condições experimentais foram realizadas em duplicado, ou em triplicado sempre que o segundo duplicado não se mostrou coerente com o primeiro. Os resultados obtidos foram avaliados com base no programa de computador *Microsoft Excel 2010*. Os parâmetros a ter em conta para posterior avaliação foram o LIRL, LD e o declive. Com estes, determinou-se a reprodutibilidade através do cálculo do desvio padrão relativo (%) da média dos potenciais da solução padrão de $2,50 \times 10^{-2} \mu\text{g/mL}$. Essa média foi possibilitada a partir das diversas calibrações sujeitas às mesmas condições de ensaio e em momentos diferentes.

O tempo de resposta foi expresso como o tempo necessário para a não variação de mais do que $\pm 0,2 \text{ mV}$. Considerando que os tempos de resposta variavam com a concentração de CEA presente na curva de calibração, optou-se por indicar apenas os maiores valores de tempo de resposta necessários para atingir o valor $\Delta E/\Delta t$ selecionado.

3. Resultados e Discussão

Neste capítulo é abordada a ligação do CEA aquando a preparação do sensor e a avaliação comparativa dos elétrodo compostos por diferentes membranas. A influência do pH na sua performance, a análise da superfície das partículas modificadas, a morfologia das membranas de PVC, assim como a análise da interferência dos diferentes iões presentes na urina na concentração do ião principal, que também foi avaliada.

3.1. Preparação do material sensor

A preparação do material sensor tipo MIP decorreu em várias etapas, em concreto: i) eletropolimerização com anilina para a formação do polímero condutor; ii) ligação da proteína CEA, com ou sem monómeros carregados; iii) eletropolimerização com OPD; v) e remoção da proteína. A impressão molecular foi realizada numa superfície de vidro, recoberto com um filme de FTO/ITO. A escolha deste substrato condutor teve em conta as suas boas propriedades condutoras para a construção de um material sensor para a deteção do CEA. Em paralelo, foram preparados materiais de controlo não impressos, NIPs, realizando os mesmos procedimentos, mas sem CEA nas soluções. O esquema geral do procedimento encontra-se representado na Figura 2.2.

A primeira fase de preparação do material sensor consistiu na deposição de uma camada fina de polianilina, PANI, sobre um vidro condutor. Esta camada foi obtida por processo de eletropolimerização do monómero anilina em meio ácido e teve como objetivo produzir uma superfície condutora que promovesse a adsorção da proteína CEA. Os grupos funcionais presentes à superfície da mesma são essencialmente grupos amina e anéis aromáticos, ambos ricos em interações eletrostáticas com proteínas, e que podem até envolver pontes de hidrogénio (no caso do grupo amina). Esta superfície permitia ainda uma ligação covalente à camada polimérica impressa, baseada em oPD, a introduzir posteriormente.

A impressão molecular propriamente dita foi realizada pela inclusão da molécula que se pretende imprimir numa matriz polimérica. Para este efeito, a proteína CEA foi incubada sobre a superfície de polianilina, para que ficasse ligada a esta aquando do processo de impressão polimérica. No essencial, a presença de CEA nesta superfície constituiu um obstáculo à polimerização (a realizar posteriormente), originando cavidades neste polímero complementares à sua conformação espacial e para as quais a proteína CEA apresentará uma elevada afinidade. Considerando que o CEA terá uma carga negativa a pH fisiológico (sendo no entanto uma espécie multi-carga), testou-se ainda o efeito da presença de um monómero carregado positivamente, o VB. Este monómero estabeleceu interações iónicas com o CEA livre em solução, permanecendo depois ao seu lado aquando do processo de adsorção do CEA à superfície de polianilina. Uma vez desencadeada a polimerização na fase seguinte, este monómero ficaria envolvido na rede polimérica por ligação covalente, ficando assim retido no polímero aquando da remoção da CEA.

O polímero impresso foi obtido por polimerização de oPD, um monómero análogo à anilina, mas com dois grupos amina vicinais ligados a um anel benzeno. A presença destes grupos permitiu a obtenção de polímeros com um elevado grau de reticulação, o que contribuiu possivelmente para uma melhor definição da cavidade impressa. A remoção da proteína CEA foi efetuada posteriormente por ação enzimática (tripsina), uma vez que esta é muito menos agressiva para o polímero impresso do que a remoção química. Este procedimento foi realizado em todos os materiais preparados, mesmo os que não tinham proteína, tendo como objetivo sujeitar todos os materiais às mesmas condições experimentais.

No essencial, os materiais sensores obtidos foram o polímero impresso, MIP, sem adição de cargas externas (PANI-CEA) ou com monómero carregado (PANI-CEA/VB), ou o polímero não impresso (PANI-PBS ou simplesmente PANI) utilizado como controlo da resposta analítica resultante da impressão molecular.

Estes materiais foram entretanto caracterizados por FTIR e Espetroscopia de Raman, seguindo-se depois a sua inclusão em membranas de PVC plastificado, tendo em vista a preparação de membranas seletivas a CEA.

3.2. Caracterização do material sensor

Apresentam-se na Figura 3.1 os espectros de Raman dos três materiais sensores, evidenciando-se diferenças gerais entre os vários materiais observados. De uma forma geral, destacou-se o espectro do material MIP com VB, cujos valores de intensidade de sinal foram muito mais elevados do que os dos demais materiais. Este espectro teve ainda a particularidade

de apresentar picos de Raman na região dos 1360 e 1560 de intensidade semelhante. Estes picos revelaram informação estrutural sobre o carbono presente na matriz polimérica, assinalando assim a presença do VB. Efetivamente, do ponto de vista conceitual os materiais MIP sem monómero e NIP deveriam ser semelhantes do ponto de vista da sua composição química, embora possam evidenciar-se diferenças reais entre estes decorrentes do processo experimental seguido (como a presença de proteína aprisionada nos MIP ou a remoção de frações diferentes dos materiais desde o seu suporte de vidro condutor, uma vez que este processo foi realizado por raspagem).

Uma outra diferença assinalável foi encontrada na região dos 2500 a 3000 cm^{-1} , na qual se observou um aumento de intensidade de Raman nos materiais MIP (com monómero e sem monómero) comparativamente aos NIP, possivelmente associado à presença de grupos funcionais de alguma nano-estrutura proteica aprisionada [73]. O valor de deslocamento de Raman foi também mais semelhante entre os materiais MIP (2845,69 cm^{-1} para material sem monómero e 2829,90 cm^{-1} para material com monómero), distinguindo-se também neste aspeto do material NIP (2798,99 cm^{-1}).

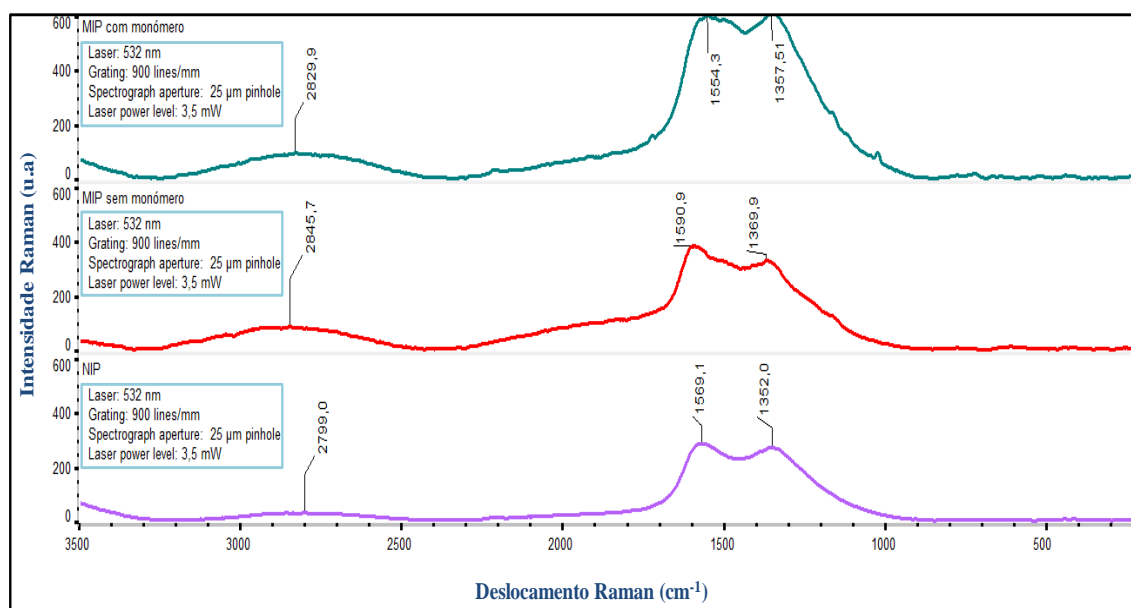


Figura 3.1. Espectros de Raman dos materiais sensores MIP sem monómero (PANI/CEA/oPD), MIP com monómero (PANI/CEA-VB/oPD) e NIP (PANI/oPD).

Os resultados obtidos nos ensaios de FTIR para os mesmos materiais encontram-se representados na Figura 3.2. Estes registos evidenciaram pontos de diferença significativa entre as membranas que apresentavam CEA, com e sem monómero na sua constituição, e o branco (NIP).

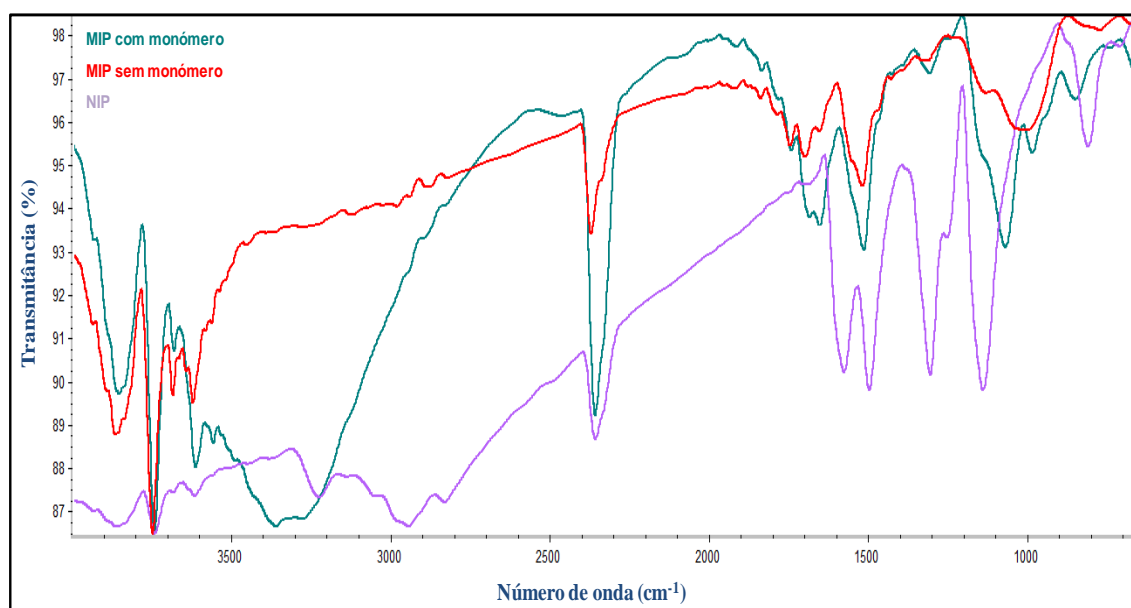


Figura 3.2. Espectros de FTIR dos materiais sensores MIP sem monómero (PANI/CEA/oPD), MIP com monómero (PANI/CEA-VB/oPD) e NIP (PANI/oPD).

De uma forma geral, os espectros de FTIR indicaram semelhanças entre os materiais sensores MIP, localizadas no intervalo de 1400 e 1600 cm^{-1} , que corresponderam possivelmente à presença da vibração de estiramento da ligação C=N. Esta vibração sugere a presença de estruturas imina e fenazina, características do composto de polimerização (oPD) [74]. As bandas de vibração análogas ao material NIP encontraram-se ligeiramente deslocadas para valores de número de onda inferiores, requerendo possivelmente menor energia.

As bandas de vibração localizadas a 1205 e 1396 cm^{-1} indicaram o efeito de deslocalização do radical semi-quinóide e deformação C-N, respetivamente, evidenciando desta forma a presença de um filme de PANI sobre o substrato condutor em todas as membranas representadas [75]. Comparando com os MIP, os materiais NIP apresentaram bandas de absorção nesta região muito superiores. Este registo deveu-se, possivelmente, à maior quantidade de polímero PANI neste material, uma vez que a ausência da proteína sobre o PANI (NIP) aumentou a área de ligação covalente entre os filmes de polímeros de anilina e de oPD, fazendo com que a raspagem do material depositado no vidro arrastasse uma maior quantidade de PANI. No caso dos materiais MIP, as regiões de filme de PANI às quais a CEA se ligou não permitiram uma ligação covalente entre os dois filmes poliméricos, fazendo com que o PANI nessa região permanecesse ligada ao vidro condutor.

Os espectros de FTIR dos materiais sensores apresentaram também diferenças muito significativas, entre 3000 e 4000 cm^{-1} . A presença do monómero no material MIP foi revelada

pela presença da banda de absorção de forte intensidade entre 3200 e 3400 cm^{-1} , relativa ao estiramento da ligação N-H em sais de amônio quaternário (como é o caso do VB). As bandas observadas para valores superiores a 3500 cm^{-1} foram associadas ao estiramento da ligação N-H nos polímeros preparados por eletropolimerização da anilina e do oPD, comuns portanto aos três materiais analisados.

3.3. Características Gerais de Funcionamento dos Sensores

A preparação de membranas seletivas foi efetuada com base na composição normal destas membranas baseadas em materiais MIP, tipicamente efetuada no laboratório BioMark e descrita na literatura inúmeras vezes. De uma forma geral, torna-se necessária a presença de um ionóforo, que é o material sensor preparado e caracterizado anteriormente, procedendo-se de seguida à sua imobilização numa matriz polimérica de PVC, plastificada com oNPOE. A preparação de uma membrana seletiva tipo NIP, análoga à membrana MIP, permitiu, por comparação direta, aferir a contribuição e a relevância do processo de impressão molecular na resposta potenciométrica do eletrodo.

Considerando que as membranas seletivas podem ainda requerer um aditivo iónico lipofílico, quando os materiais sensores se apresentam sem qualquer carga, e que o CEA se encontra carregado negativamente a pH fisiológico, testou-se também o efeito da adição de um aditivo lipofílico catiónico às membranas (TOB). De uma forma geral, a presença deste aditivo deverá reduzir a interferência de espécies iónicas de carga contrária e diminuir a resistência elétrica das membranas. Tendo em vista assegurar que a resposta potenciométrica das membranas que continham TOB não dependia apenas deste componente, foi ainda preparada uma membrana seletiva controlo, sem ionóforo e com TOB.

Considerando que o CEA é uma proteína multi-carga, cujo grau de ionização depende grandemente do pH da solução, e que as espécies detetadas por eletrodos seletivos são sempre e apenas iões, os estudos de caracterização/otimização da resposta dos ESIs centraram-se inicialmente na avaliação da influência do pH. Os ensaios efetuados nesta fase avaliaram o efeito de ligeiras variações no valor de pH de uma mesma solução tampão (HEPES, pH 4,4 e 5,8).

As curvas de calibração típicas obtidas em solução tampão HEPES, 1×10^{-2} mol/L, com pH igual a 4,4 encontram-se representadas na Figura 3.3. Estas curvas de calibração foram traçadas para concentrações de CEA entre 42 e 625 pg/mL, originando sempre declives aniónicos (associados por isso à presença de CEA carregada negativamente). De uma forma geral, observou-se que os materiais MIP 1 e NIP foram incapazes de promover variações de

potencial significativas, um comportamento oposto ao observado para os elétrodos com o material MIP 2. Por outro lado, a presença do aditivo TOB intensificou as variações de potencial registadas ou não promoveu uma alteração significativa no registo de calibração dos elétrodos correspondentes sem aditivo; este contributo foi aferido pelo registo de curvas de calibração para TOB como ionóforo com declives iguais a -65,1 mV/década (ESI 7).

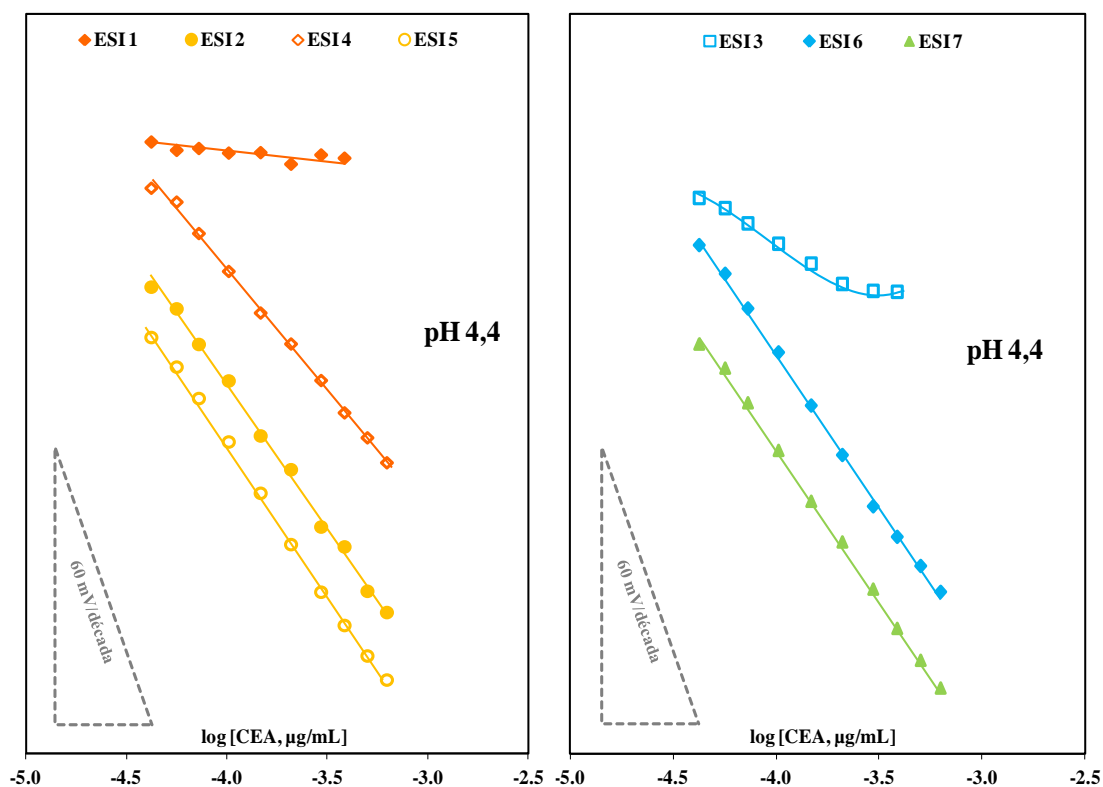


Figura 3.3. Curvas de calibração em solução tampão HEPES, pH de 4,4.

A utilização de PANI/CEA/oPD como ionóforo potenciométrico não promoveu uma variação de sinal útil do ponto de vista prático, com um valor médio de declive igual -5,5 mV/década (ESI 1), enquanto que os seus análogos com aditivo TOB forneceram um declive igual a -52,0 mV/década (ESI 4), atestando assim o efeito benéfico da presença deste aditivo nestes elétrodos. Este comportamento indicou que o material sensor PANI/CEA/oPD atuou como um ionóforo neutro, requerendo a presença de um elemento carregado na membrana para promover uma variação de potencial assinalável. Um registo análogo foi obtido com o material PANI/oPD, portanto NIP, cujo declive médio foi igual a -27,4 mV/década (ESI 3) quando na ausência do aditivo, tendo aumentado para -66,6 mV/década após inclusão do aditivo TOB na membrana (ESI 6).

O material sensor PANI/CEA-VB/oPD promoveu um comportamento potenciométrico muito diferente dos demais materiais, com valores de declive médios iguais a $-61,9$ mV/década (ESI 2) sem a presença de qualquer aditivo. Este registo confirmou por isso a presença de VB na membrana seletiva. A estrutura do VB apresenta um sal de amónio quaternário, o que conduziu à presença constante de cargas positivas no interior de membrana seletiva, diminuindo assim a resistência elétrica da membrana lipófila à permeação de iões. Consequentemente, a presença do aditivo TOB conjuntamente com o material MIP 2 não se fez sentir de modo significativo no registo potenciométrico, com os declives médios a apresentarem valores iguais a $-65,3$ mV/década.

Neste sentido, os resultados obtidos em solução tampão pH 4,4 indicaram que a inclusão de monómeros carregados positivamente aquando da preparação do material impresso promoveu um aumento de sensibilidade significativo na resposta potenciométrica e que a resposta dos elétrodos foi grandemente dominada pela presença de cavidades impressas, sendo a contribuição da resposta não específica observada nos materiais NIP muito pouco significativa. Por outro lado, a presença de TOB fez-se notar apenas nos elétrodos cujas características de resposta foram menos adequadas, nomeadamente os elétrodos com materiais MIP 1 (mudança característica do comportamento ESI 1 comparado com ESI 4) e NIP (mudança característica do comportamento ESI 3 comparado com ESI 6). O aditivo TOB foi também capaz de promover uma resposta potenciométrica adequada, mesmo sem o ionóforo (ESI 7), tal como esperado.

O registo de curvas de calibração dos ESI quando se subiu o valor de pH do meio, de 4,4 para 5,8, indicou uma redução significativa da sensibilidade da resposta potenciométrica e da gama de concentrações ao longo da qual se observou uma resposta linear (Figura 3.4).

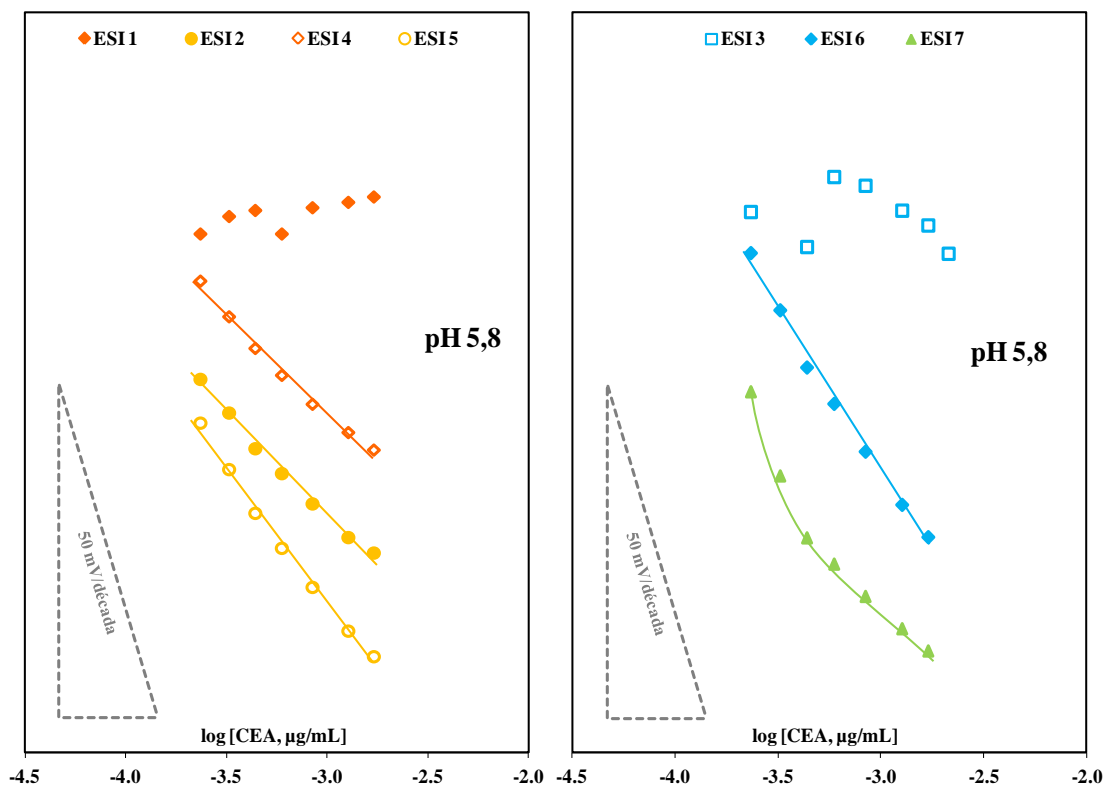


Figura 3.4. Curvas de calibração em solução tampão HEPES, pH de 5,8.

Comparando com a resposta a pH 4,4, a presença de um comportamento linear a pH 5,8 foi associada sempre a valores de concentração de CEA superiores, entre 233 e 2500 pg/mL, sendo a sensibilidade correspondente também inferior, traduzida pelo declive negativo mais elevado (menor, portanto, em valor absoluto).

Considerando todos resultados obtidos em meio tampão HEPES, foi possível identificar o valor de pH 4,4 como o melhor valor para realizar as curvas de calibração dos elétrodos. Este valor tornou-se assim orientador para os ensaios posteriores. A fixação deste valor seria, no entanto, precoce, uma vez que a presença de outras espécies no meio, para além de HEPES e CEA, poderia condicionar a resposta dos elétrodos. Optou-se por isso por realizar, de seguida, o estudo de seletividade.

3.4. Seletividade em urina

Qualquer dispositivo potenciométrico carece de uma avaliação de seletividade, uma vez que a aplicação dos elétrodos em condições reais implica uma coexistência do CEA com outras espécies iónicas diferentes e que podem condicionar mais ou menos severamente a resposta

observada em condições controladas. A seletividade potenciométrica é habitualmente aferida com base na determinação dos valores de coeficiente de seletividade potenciométrica, recorrendo aos métodos descritos na introdução.

Face às várias limitações técnicas associadas a esses métodos e considerado que o objetivo deste trabalho foi aplicar o eletrodo desenvolvido à determinação de CEA em fluidos biológicos, optou-se por avaliar a seletividade através do comportamento potenciométrico de curvas de calibração realizadas em meio tampão com fluido biológico. Considerando ainda que era um objetivo deste trabalho a utilização de amostras reais e que não foi possível ter acesso a soro de indivíduos doentes ou saudáveis, optou-se por avaliar a calibração em urina. A solução de urina foi diluída em HEPES, a vários níveis de diluição, com registo de valores de pH diferentes (iguais a 4,3 e 4,9).

Neste sentido, a fase seguinte deste estudo compreendeu a realização de curvas de calibração em urina real diluída em solução tampão HEPES, com valores de pH iguais a 4,3 ou 4,9. A título de exemplo, os resultados obtidos para os materiais MIP, com ou sem TOB, encontram-se representados na Figura 3.5.

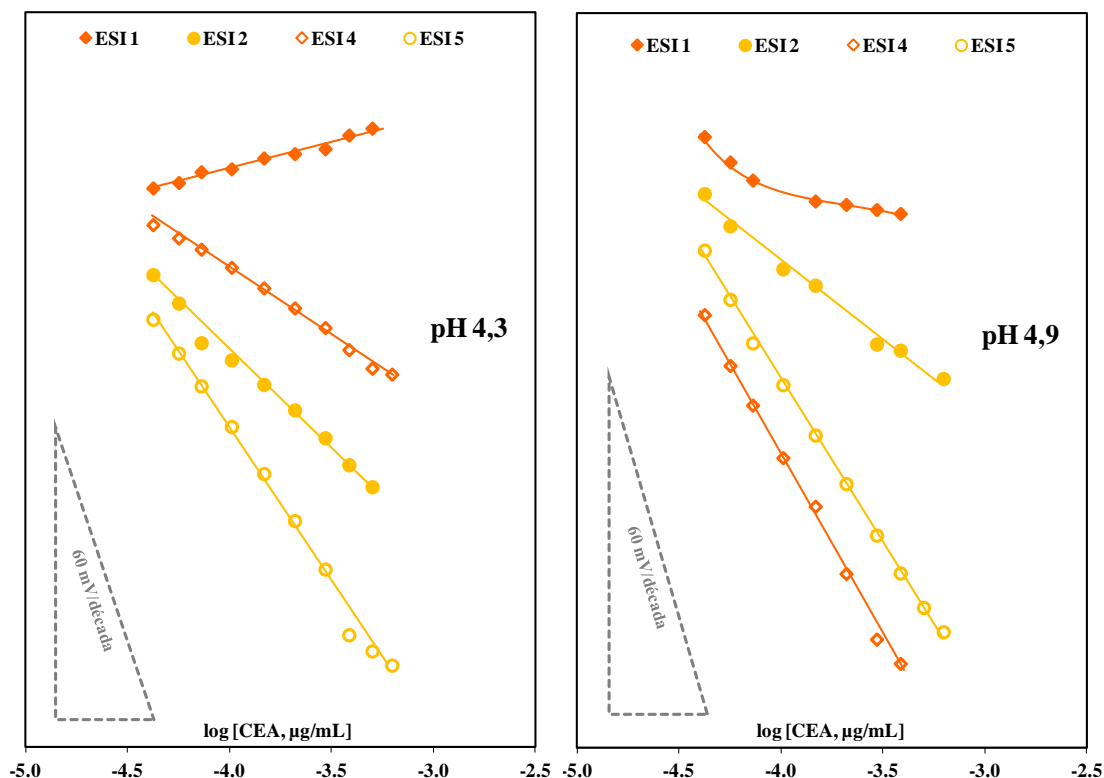


Figura 3.5. Calibrações em urina diluída com diferentes valores de pH (4,3 e 4,9).

Considerando os valores obtidos em urina diluída a pH 4,3, o comportamento dos materiais MIP foi de alguma forma consistente com os resultados obtidos em solução tampão. Os materiais MIP 2 originaram elétrodos mais sensíveis do que os MIP 1 e a presença do aditivo TOB melhorou a sensibilidade da resposta. Em concreto, os ESIs 1 e 4 apresentaram declives iguais a +11,1 e -27,0 mV/década, respetivamente, e os ESIs 2 e 5 apresentaram declives iguais a -38,4 e -63,2 mV/década, respetivamente. A resposta linear foi observada ao longo de toda a região de calibração, entre 38 e 625 pg/mL, semelhante, por isso, à região de calibração em solução tampão com pH 4,4. O registo de calibração dos ESIs 7, cujos resultados não se apresentam neste documento, foi também consistente com este comportamento e com os valores de declive observados para os elétrodos com o aditivo TOB.

Os elétrodos sem TOB avaliados em urina a pH 4,9 evidenciaram características de resposta semelhantes às obtidas nos ensaios a pH 4,3. Nestas condições, os valores de declive obtidos para os ESI 1 e 2 foram iguais a, respetivamente, -5,3 e -27,6 mV/década. Os elétrodos com TOB indicaram, porém, aumentos significativos na sensibilidade, com declives dos ESIs 4 e 5 iguais a -65,1 e -57,3 mV/década, respetivamente. Estes aumentos significativos de sensibilidade indicam porém uma elevada sensibilidade dos elétrodos à variação do pH da solução analisada, o que se pode tornar crítico na análise de amostras reais.

De uma forma geral, a utilização de urina diluída promoveu uma redução de sensibilidade dos ESIs com materiais MIP 2, um comportamento inerente à presença de um elevado número de interferentes em contacto direto com a membrana seletiva. Essa redução de sensibilidade não condicionou porém uma possível aplicação prática destes elétrodos, uma vez que o valor teórico de declive esperado depende do grau de ionização da proteína nas condições de ensaio, uma informação que parece ainda ser desconhecida. Embora os elétrodos com MIP e TOB tivessem apresentado uma maior sensibilidade, a escolha destes elétrodos poderia não ser a mais adequada do ponto de vista prático, face à grande variabilidade do seu comportamento perante pequenas variações de pH.

3.4.1. Aplicação Analítica

Recorrendo às melhores condições de trabalho selecionadas anteriormente, procedeu-se à aplicação do dispositivo na determinação de CEA numa amostra diluída de urina. Para este efeito, os elétrodos foram mergulhados na amostra diluída e foram efetuadas adições de solução tampão de modo a promover diferentes níveis de concentração de CEA no meio, sendo estes valores diferentes daqueles presentes na curva de calibração realizada com soluções padrão. Os níveis de concentração de CEA escolhidos para este ensaio não foram definidos de acordo com

os valores esperados fisiologicamente, uma vez que não foi possível encontrar um valor de *cut-off* para a urina. Existem sim níveis de CEA com interesse clínico no sangue, que referem geralmente concentrações superiores a 5 ng/mL relacionados com uma possível evolução da doença cancerígena, entre as quais o cancro do colo-retal.

Os elétrodos utilizados neste ensaio apresentavam como material sensor PANI/CEA-VB/oPD, tendo sido calibrados antes da análise da urina. O registo de calibração obtido encontra-se representado na Figura 3.6, tendo-se obtido um declive igual -49,0 mV/década, com um limite de deteção de 42 pg/mL e um coeficiente de correlação de 0,996. Os valores de potencial correspondentes à análise da amostra de urina real dopada com CEA encontram-se também representadas graficamente na Figura 3.6. (direita). A resposta linear relativa a esta região de concentrações correspondeu a um declive igual a -38,6 mV/década e um coeficiente de correlação de 0,999.

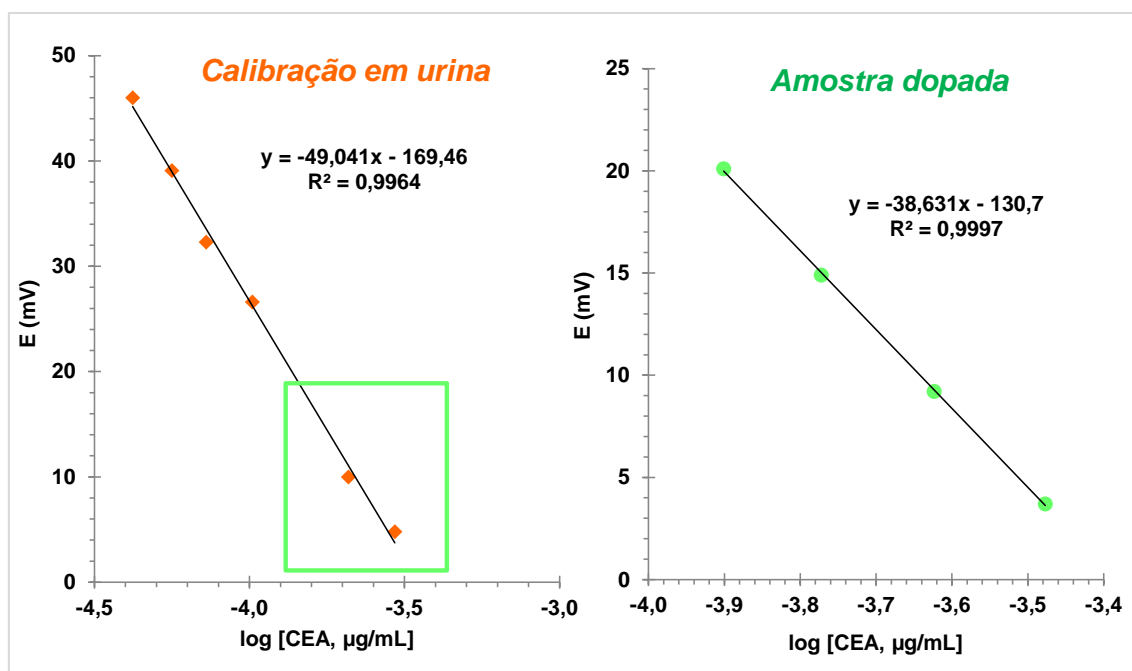


Figura 3.6. Calibração do ESI 2 (esquerda) e aplicação numa amostra sucessivamente diluída.

O cálculo das concentrações de CEA presentes na amostra no decurso dos vários graus de diluição originou erros sempre inferiores a 10%. Aos valores teóricos de concentração de CEA iguais a 125,6; 168,9; 238,1 e 333,3 pg/mL, corresponderam valores experimentais iguais a 137,1; 176,6; 233,3 e 305,1 pg/mL. Estes valores encontram-se também representados na Figura 3.7. Os erros associados a esta análise foram por isso +9, +5, -2 e -8%, respetivamente, correspondendo a um erro médio igual a +1% (com um desvio padrão numérico igual a $\pm 0,08$ pg/mL).

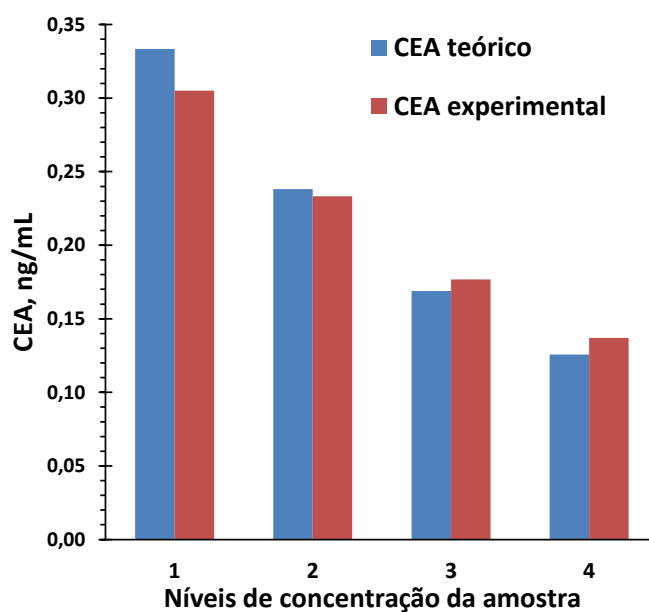


Figura 3.7. Concentrações de CEA teóricas e experimentais obtidas em amostras de urina.

De uma forma geral, a aplicação dos elétrodos com o material sensor PANI/CEA-VB/oPD (e sem aditivo TOB) na análise de urina diluída e dopada com CEA padrão produziu os resultados exatos e precisos. A aplicação prática deste dispositivo em contexto real carece porém da aplicação do mesmo na análise de amostras reais de soro, incluindo amostras de indivíduos saudáveis e doentes.

4. Conclusão

A técnica de impressão molecular do CEA em superfície foi desenvolvida com sucesso, recorrendo a processos tecnicamente simples. A introdução de um monómero carregado na fase de impressão molecular revelou-se importante, contribuindo para que a resposta potenciométrica não dependesse da adição de aditivos lipofílicos externos (como é habitual no caso de impressão molecular de proteínas). A interação entre o CEA e os materiais biomiméticos revelou-se de grande importância, uma vez que os materiais sem impressão molecular não promoveram uma resposta potenciométrica adequada.

De uma forma geral, a metodologia de conceção dos sensores revelou-se simples, com baixo tempo de resposta, baixo limite de deteção e a boa sensibilidade para a deteção do CEA. Com a escolha de uma membrana adequada, o método proposto foi simples, sensível, de baixo custo e alternativo aos métodos analíticos já existentes para a deteção do CEA.

No entanto, como em todos os trabalhos, é importante considerar que este sensor biomimético poderia ser alvo de melhorias posteriores. Tendo em conta estudos já concretizados, seria interessante a sua aplicação numa outra amostra biológica, como soro ou saliva, a sua aplicação com uma abordagem técnica diferente, incluindo o mesmo material sensor em dispositivos miniaturados com leitura elétrica, ou a sua fusão com leituras óticas pela introdução de marcadores apropriados, entre outros.

5. Referências Bibliográficas

- [1] APIFARMA; Dia Nacional do Cancro Digestivo. Lisboa; 2010 [atualizado em 30 de Setembro de 2010; citado a 2014, 6 de Janeiro]. Disponível em: <http://www.apifarma.pt/publicacoes/factsheetsAD/Paginas/cancrodig30Set.aspx>
- [2] Jorge Cruz, Prevenção do cancro do intestino, <http://falemosdesaude.blogspot.pt/2013/06/prevencao-do-cancro-do-intestino.html>, 25 de Junho de 2013.
- [3] LIND, G. E.; RAIBORG, C.; DANIELSEN S. A.; ROGNUM T. O.; THIIIS-EVENSEN E.; Hoff G.; NESBAKKEN A.; STENMARK H.; LOTHE R. A. SPG20, a novel biomarker for early detection of colorectal cancer, encodes a regulator of cytokinesis. *Oncogene, Macmillan Publishers Limited*, 2011, 30, 3967-3978.
- [4] TANAKA, T.; TANAKA, M.; TANAKA, T.; ISHIGAMORI, R. Biomarkers for Colorectal Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 2010, 11, 3209-3225.
- [5] DUFFY, M. J. Carcinoembryonic Antigen as a Marker for Colorectal Cancer: Is It Clinically Useful. *Clinical Chemistry*, 2011, 47, 624-630.
- [6] CASEY, B., J.; KOFINAS, P. Selective binding of carcinoembryonic antigen using imprinted polymeric hydrogels. *Journal of Biomedical Materials Research, Part A*, 2008, 87, 359-363.
- [7] YANG, H.; YUAN, R.; CHAI, Y.; MAO, L.; SU, H.; JIANG, W.; LIANG, M. Electrochemical immunosensor for detecting carcinoembryonic antigen using hollow T nanospheres-labeled multiple enzyme-linked antibodies as labels for signal amplification. *Biochemical Engineering Journal, Elsevier*, 2011, 56, 116-124.
- [8] MIAO, X.; ZOU, S.; ZHANG, H.; LING, L. Highly sensitive carcinoembryonic antigen detection using Ag@Au core-shell nanoparticles and dynamic light scattering. *Sensors and Actuators B: Chemical, Elsevier*, 2013, 191, 396-400.
- [9] LADD, J.; LU, H.; TAYLOR, A. D.; GOODELL, V.; DISIS, M. L.; JIANG, S. Direct detection of carcinoembryonic antigen autoantibodies in clinical human serum samples using a surface plasmon resonance sensor. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, Elsevier*, 2008, 70, 1-6.

- [10] WANG, Y.; ZHANG, Z.; JAIN, V.; Yi, J.; MUELLER, S.; SOKOLOV, J.; LIU, Z.; LEVON, K.; RIGAS, B.; RAFAILOVICH, M. H. Potentiometric sensors based on surface molecular imprinting: Detection of cancer biomarkers and viruses. *Sensors and Actuators B: Chemical, Elsevier*, 2010, 146, 381-387.
- [11] ZHONG, Z.; WU, W.; WANG, D.; SHAN, J.; QUING, Y.; ZHANG, Z. Nanogold-enwrapped graphene composites as trace labels for sensitivity enhancement of electrochemical immunosensors in clinical immunoassays: Carcinoembryonic antigen as a model. *Biosensors and Bioelectronics, Elsevier*, 2010, 25, 2379-2383.
- [12] LV, P.; MIN, L.; YUAN, R.; CHAI, Y.; CHEN, S. A novel immunosensor for carcinoembryonic antigen based on poly(diallylmethylammonium chloride) protected prussian blue nanoparticles and double-layer nanometer-sized gold particles. *Microchim Acta, Springer-Verlag*, 2010, 171, 297-304.
- [13] WANG, G.; ZHANG, G.; HUANG, H.; WANG, L. Graphene-Prussian blue/gold nanoparticles based electrochemical immunoassay of carcinoembryonic antigen. *Analytical Methods*, 2011.
- [14] DAI, Z.; CHEN, J.; YAN, F.; JU, H. Electrochemical sensor for immunoassay of carcinoembryonic antigen based on thionine monolayer modified gold electrode. *Cancer Detection and Prevention, Elsevier*, 2004, 29, 233-240.
- [15] TANG, D.; XIA, B. Electrochemical immunosensor and biochemical analysis for carcinoembryonic antigen in clinical diagnosis. *Microchimica Acta, Springer-Verlag*, 2008, 163, 41-48.
- [16] FU, Y.; YUAN, R.; CHAI, Y.; ZHANG, Y.; PENG, Y. Electrochemical immunoanalysis for Carcinoembryonic Antigen Based on Multilayer Architectures of Gold Nanoparticles and Polycation Biomimetic Interface on Glassy Carbon Electrode. *Electroanalysis*, 2006, 18, 2451-2457.
- [17] LI, J.; GAO, H.; CHEN, Z.; WEI, X.; YANG, C. An electrochemical immunosensor for carcinoembryonic antigen enhanced by self-assembled nanogold coatings on magnetic particles. *Analytica Chimica Acta, Elsevier*, 2010, 665, 98-104.
- [18] LIU, Z.; MA, Z. Fabrication of an ultrasensitive electrochemical immunosensor for CEA based on conducting long-chain polythiols. *Biosensors and Bioelectronics, Elsevier*, 2013, 46, 1-7.
- [19] CAO, X.; WANG, N.; JIA, S.; GUO, L.; LI, K. Bimetallic AuT nanochains: Synthesis and their application in electrochemical immunosensor for the detection of carcinoembryonic antigen. *Biosensors and Bioelectronics, Elsevier*, 2012, 39, 226-230.

- [20] SHU, H.; WEN, W.; XIONG, H.; ZHANG, X.; WANG, S. Novel electrochemical aptamer biosensor based on gold nanoparticles signal amplification for the detection of carcinoembryonic antigen. *Electrochemistry Communications, Elsevier*, 2013, 37, 15-19.
- [21] PAN, J.; YANG, Q. Antibody-functionalized magnetic nanoparticles for the detection of carcinoembryonic antigen using a flow-injection electrochemical device. *Analytical and Bioanalytical Chemistry, Springer-Verlag*, 2007, 388, 279-286.
- [22] NOROUZI, P.; GUTA, V. K.; FARIDBOD, F.; PIRALI-HAMEDANI, M.; LARIJANI, B.; GANJALI, M. R. Carcinoembryonic Antigen Admittance Biosensor Based on Au and ZnO Nanoparticles Using FFT Admittance Voltammetry. *Analytical Chemistry*, 2011, 83, 1564-1570.
- [23] YU, Q.; WANG, X.; DUAN, Y. Capillary-Based Three-Dimension Immunosensor Assembly for High-Performance Detection of Carcinoembryonic Antigen Using Laser-Induced Fluorescence Spectrometry. *Analytical Chemistry*, 2014, 86, 1518-1524.
- [24] HOU, J.; LIU, T.; LIN, G.; LI, Z.; ZOU, L.; LI, M.; WU, Y. Development of an immunomagnetic bead-based time-resolved fluorescence immunoassay for rapid determination of levels of carcinoembryonic antigen in human serum. *Analytica Chimica Acta*, 2012, 734, 93-98.
- [25] ALTINTAS, Z.; ULUDAG, Y.; GURBUZ, Y.; TOTHILL, I. Surface plasmon resonance based immunosensor for the detection of the cancer biomarker CEA. *Talanta, Elsevier*, 2011, 86, 377-383.
- [26] CHON, H.; LEE, S.; SON, S.; OH, C.; CHOO, J. Highly Sensitive Immunoassay of Lung Cancer Marker Carcinoembryonic Antigen Using Surface-Enhanced Raman Scattering of Hollow Gold Nanospheres. *Analytical Chemistry*, 2009, 81, 3029-3034.
- [27] QUYEN, T. T. B.; CHANG, C.; SU, W.; UEN, Y.; PAN, C.; LIU, J.; RICK, J.; LIN, K.; HWANG, B. Self-focusing Au@SiO₂ nanorods with rhodamine 6G as highly sensitive SERS substrate for CEA detection. *Journal of Materials Chemistry B*, 2014, 2, 629-636.
- [28] CHEN, G.; CHEN, Y.; ZHENG, X.; HE, C.; LU, J.; FENG, S.; CHEN, R. ZENG, H. Surface-enhanced Raman scattering study of carcinoembryonic antigen in serum from patients with colorectal cancers. *Applied Physics B, Lasers and Optics, Springer-Verlag*, 2013, 113, 597-602.
- [29] ZENG, Q.; MAO, X.; XU, H.; WANG, S.; LIU, G. Quantitative Immunochromatographic Strip Biosensor for the Detection of Carcinoembryonic Antigen Tumor Biomarker in Human Plasma. *American Journal of Biomedical Sciences*, 2009, 1, 70-79.

- [30] MIAO, X.; ZOU, S.; ZHANG, H.; LING, L. Highly sensitive carcinoembryonic antigen detection using Ag@Au core-shell nanoparticles and dynamic light scattering. *Sensors and Actuators B: Chemical, Elsevier*, 2013, 191, 396-400.
- [31] LIU, M.; JIA, C.; JIN, Q.; LOU, X.; YAO, S.; XIANG, J.; ZHAO, J. Novel colorimetric enzyme immunoassay for the detection of carcinoembryonic antigen. *Talanta, Elsevier*, 2010, 81, 1625-1629.
- [32] TAN, F.; YAN, F.; JU, H. A designer ormosil gel for preparation of sensitive immunosensor for carcinoembryonic antigen based on simple direct electron transfer. *Electrochemistry Communications, Elsevier*, 2006, 8, 1835-1839.
- [33] LIN, J.; YAN, F.; JU, H. Noncompetitive enzyme immunoassay for carcinoembryonic antigen by flow injection chemiluminescence. *Clinica Chimica Acta, Elsevier*, 2003, 341, 109-115.
- [34] HAO, M.; MA, Z. An Ultrasensitive Chemiluminescence Biosensor for Carcinoembryonic Antigen Based on Autocatalytic Enlargement of Immunogold Nanoprobes. *Sensors*, 2012, 12, 17320-17329.
- [35] QU, S.; LIU, J.; LUO, J.; HUANG, Y.; SHI, W.; WANG, B.; CAI, X. A rapid and highly sensitive portable chemiluminescent immunosensor of carcinoembryonic antigen based on immunomagnetic separation in human serum. *Analytica Chimica Acta, Elsevier*, 2013, 766, 94-99.
- [36] JIANG, J.; ZHAO, S.; HUANG, Y.; QIN, G.; YE, F. Highly sensitive immunoassay of carcinoembryonic antigen by capillary electrophoresis with gold nanoparticles amplified chemiluminescence detection. *Journal of Chromatography A, Elsevier*, 2013, 1282, 161-166.
- [37] MOREIRA, A. *Desenvolvimento de um Biossensor para a Hemoglobina*. Dissertação de Mestrado, Instituto Superior de Engenharia do Porto, Porto, 2013.
- [38] PAULING, L. J. A Theory of the Structure and Process of Formation of Antibodies. *Journal of the American Chemical Society*, 1940, 62, 2643-2675.
- [39] PILETSKY, S.; TURNER, A. Molecular Imprinting of Polymers. 1^a ed. Texas: *Eurekah.com, Landes Bioscience*, 2006.
- [40] OPIK, A.; MENAKER, A.; REUT, J.; SYRITSKI, V. Molecularly imprinted polymers: a new approach to the preparation of functional materials. *Department of Materials Science*, Tallinn University of Technology, Estonia, 2009.
- [41] HILLBERG, A. L.; TABRIZIAN, M. Biomolecule imprinting: Developments in mimicking dynamic natural recognition systems. *IRBM, Elsevier*, Janeiro, 2008.

- [42] MOREIRA, F. T. C.; DUTRA, R. A. F.; NORONHA, J. P. C.; CUNHA, A. L.; SALES, M. G. F. Artificial antibodies for troponin T by its imprinting on the surface of multiwalled carbon nanotubes: Its use as sensory surfaces. *Biosensors and Bioelectronics*, Porto, Portugal, 2011.
- [43] GAI, Q.; LIU, Q.; LI, W.; HE, X.; CHEN, L.; ZHANG, Y. Preparation of bovine hemoglobina-imprinted polymer beads via the photograftingsurface-modified method. *Higher Education Press and Springer-Verlag, Front. Chem.*, 2008, 3, 370-377.
- [44] TAN, C. J.; CHUA, H. G.; KER, K. H.; TONG, Y. W. Preparation of Bovine Serum Albumin Surface-Imprinted Submicrometer Particles with Magnetic Suscetibility through Core-Shell Miniemulsion Polymerization. *National University of Singapore*, 2008.
- [45] LI, L.; He, X.; CHEN, L.; ZHANG, Y. Preparation of novel bovine hemoglobin surface-imprinted polystyrene nanoparticles with magnetic susceptibility. *Science and China Press, Series B Chemistry*, 2009, 52, 1402-1411.
- [46] CAIL, D.; REN, L.; ZHAO, H.; XU, C.; ZHANG, L.; YU, Y.; WANG, H.; LAN, Y. ROBERTS, M. F.; CHUANG, J.; NAUGHTON, M. J.; REN, Z.; CHILES, T. C. A molecular-imprint nanosensor for ultrasensitive detection of proteins. *Nature Nanotechnology*, 2010, 5, 597-601.
- [47] REDDY, S. M.; SETTE, G.; PHAN, Q. Electrochemical Probing of Selective Hemoglobin Binding in Hydrogel-based Molecularly Imprinted Polymers. *Faculty of Health and Medical Sciences, Elsevier*, 2011, 56, 9203-9208.
- [48] LI, Y.; Yang, H.; YOU, Q.; ZHUANG, Z.; WANG, X. Protein Recognition via Surface Molecularly Imprinted Polymer Nanowires. *Analytical Chemistry*, 2006, 78, 317-320.
- [49] LIANG, R.; ZHANG, R.; QIN, W. Potentiometric sensor based on molecularly imprinted polymer for determination of melamine in milk. *Sensors and Actuators B: Chemical, Elsevier*, 2009 141, 544-550.
- [50] JANIAK, D.; KOFINAS, P. Molecular imprinting of petides and proteins in aqueous media. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2007, 389, 399-404.
- [51] PUOCI, F.; CIRILLO, G.; CURCIO, M.; IEMMA, F.;PARISI, O. I.; SPIZZIRRI U. G.; PICCI, N. Molecularly Imprinted Polymers (MIPs) in Biomedical Applications. *Department of Pharmaceutical Sciences, University of Calabria*.
- [52] GUERREIRO, J. R. L.; SALES, M. G. F.; MOREIRA, F. T. C.; REBELO, T. S. R. Selective recognition in potentiometric transduction of amoxicillin by molecularly imprinted materials, *European Food Research & Technology, Springer-Verlag*, 2010, 232, 39-50.

- [53] NETO, J. Sensor amperométrico a base de um polímero de impressão molecular com protoporfirina ix de ferro para a determinação de 4-aminofenol, *Universidade Federal do Maranhão - Centro de Ciências Exatas e Tecnologia*, São Luís, 2010.
- [54] Encyclopedia Britannica, Science & Technology
<http://www.britannica.com/EBchecked/topic/468716/chemistry-of-industrial-polymers/76391/Ring-opening-metathesis-polymerization?anchor=ref608608>
- [55] NEWMAN, J. D.; SETFORD, S. J.; Enzymatic Biosensors, *Molecular Biotechnology*, Springer, 2006, 32, 249-268.
- [56] MOREIRA, F. T. C.; DUTRA, R. A. F.; NORONHA, J. P. C.; Sales, M. G. F. Electrochemical biosensor based on biomimetic material for myoglobin detection. *Electrochimica Acta*, Elsevier, 2013, 107, 481-487.
- [57] SHEIKHOLESLAM, M.; PRITZKER, M. D.; CHEN, P.; Electrochemical Biosensor for Glycated Hemoglobin (HbA1c). *Biosensors for Health, Environment and Biosecurity*, University of Waterloo, Canada.
- [58] OLIVEIRA, N. M. P. Biossensor para detecção do antígeno específico da próstata. Universidade de Aveiro, Departamento de Biologia, 2011.
- [59] MISTRY, K. K.; LAYEK, K.; MAHAPATRA, A.; ROYCHAUDHURI, C.; SAHA, H. A Review on Amperometric Type Immunosensors Based on Screen-Printed Electrodes. *Analyst*, 2014, 139, 2289-2311.
- [60] Buck R. P., Cosofret V. V., Recommended procedures for calibration of ion-selective electrodes. *Pure and Applied Chemistry*, 1993, 65, 1849-1858.
- [61] ZOSKI, C. G. Handbook of Electrochemistry. Elsevier, 1.^a ed., Reino Unido. 2007. ISBN-13: 978-0-444-51958-0, ISBN-10: 0-444-51958-0.
- [62] QUEIRÓS, R. B. Biosensors for the detection and quantification of aquatic bacterial contamination in waters for human use. *Tese de Doutorado* - Departamento de Física e Astronomia da Faculdade de Ciências Universidade do Porto, Porto, 2013.
- [63] MOREIRA, F. Determinação de Norfloxacin em aquacultura. *Dissertação de Mestrado* – Faculdade de Ciências Universidade do Porto, 2009.
- [64] MOREIRA, F. T. C.; DUTRA, R. A. F.; NORONHA, J. P. C., SALES, M. G. F. Myoglobin-biomimetic electroactive materials made by surface molecular imprinting on sílica beads and their use as ionophores in polymeric membranes for potentiometric transduction. *Biosensors and Bioelectronics*, Elsevier, 2011, 26, 4760-4766.
- [65] GANJALI, M. R.; FARIDBOD, F.; SABOURY, A. A.; DAVARKHAH, N.; DIVSALAR, A.; BEHBEHANI, G. R.; NOROUZI, P. A New Approach for Protein

Binding Isotherm Analysis by Means of an Electrochemical Microsensor. *International Journal of Electrochemical Science*, 2010, 5, 630-638.

- [66] WANG, Y.; ZHOU, Y.; SOKOLOV, J.; RIGAS, B.; LEVON, K.; RAFAILOVICH, M.; A potentiometric protein sensor built with surface molecular imprinting method. *Biosensors and Bioelectronics*, Elsevier, 2008, 24, 162-166.
- [67] QU, L.; XIA, S.; BIAN, C.; SUN, J.; HAN, J. A micro-potentiometric hemoglobin immunosensor based on electropolymerized polypyrrole-gold nanoparticles composite. *Biosensors and Bioelectronics*, Elsevier, 2008, 24, 3419-3424.
- [68] BUCK, R. P.; LINDNER, E. Recommendations for Nomenclature of Ion-Selective Electrodes. *International Union of Pure and Applied Chemistry*, 1994, 66, 2527-2536.
- [69] BURNETT, R. W.; COVINGTON, A. K.; FOGH-ANDERSEN, N.; KULPMANN, W. R.; LEWENSTAM, A.; MAAS, A. H. J.; MULLER-PLATHE, O.; VANKESSEL, A. L.; ZIJLSTRA, W. Use of Ion-Selective Electrodes for Blood-Electrolyte Analysis. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 2000, 38, 363–370.
- [70] UMEZAWA, Y.; UMEZAWA, K.; SATO, H. Selectivity coefficients for ion-selective electrodes: recommended methods for reporting $K_{A,B}^{pot}$ values. *International union of pure and applied chemistry*. 1995, 67, 507 - 518.
- [71] ATES, M.; A review study of (bio)sensor systems based on conducting polymers. *Materials Science and Engineering C*, 2013, 33, 1853–1859.
- [72] UMEZAWA, Y.; BUHLMANN, P.; UMEZAWA, K.; TOHDA, K.; AMEMIYA, S. Potentiometric selectivity coefficients of ion-selective electrodes Part I. Inorganic cations - (Technical report). *Pure and Applied Chemistry*, 2000, 72, 1851-2082.
- [73] SOCRATES, G., Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies. 3rd Edition ed.; John Wiley & Sons, Ltd: 2001.
- [74] OLGUN, U.; GULFEN, M. Doping of poly(o-phenylenediamine): Spectroscopy, voltammetry, conductivity and band gap energy. *Reactive & Functional Polymers*, Elsevier, 2014, 77, 23-29.
- [75] ROY, A. K.; S, N. V.; DHAND, C.; MALHOTRA, B. D. Molecularly imprinted polyaniline film for ascorbic acid detection. *Molecular Recognition, Wiley Online Library*, 2011, 24, 700-706.